

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

# **Étude fonctionnelle des complexes transcriptionnels SCL hématopoïétiques**

par

Julie Lambert

Programmes de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de docteur  
en Biologie Moléculaire

21 octobre, 2008



© Julie Lambert, 2008

Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Étude fonctionnelle des complexes transcriptionnels SCL hématopoïétiques

présentée par :  
Julie Lambert

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Marc Therrien, président-rapporteur  
Trang Hoang, directeur de recherche  
Éric Rassart, membre du jury  
Jacques Galipeau, examinateur externe  
Gregory Emery, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Le système hématopoïétique est composé d'une vaste gamme de types cellulaires afin de remplir ses nombreuses fonctions. D'un point de vue moléculaire, les facteurs de transcription hémato-spécifiques sont les principaux régulateurs de cette diversité. Ils régulent spatio-temporellement l'expression de leurs gènes-cibles et déterminent ainsi le comportement cellulaire. Les facteurs de transcription interagissent au sein de complexes multi-protéiques et les différentes combinaisons procurent toute la versatilité et l'adaptabilité requises au système hématopoïétique. Les complexes transcriptionnels nucléés par le facteur de transcription hémato-spécifique SCL/TAL-1 constituent un modèle pour l'étude des interactions combinatoires. SCL est un régulateur-clé de l'hématopoïèse affectant particulièrement deux compartiments cellulaires : les cellules souches et les érythrocytes. Afin d'activer ou de réprimer l'expression de ses gènes-cibles, SCL doit interagir avec plusieurs partenaires protéiques, dont les facteurs E2A, GATA-1, LMO2 et LDB1. En fonction du contexte cellulaire, la combinatoire des partenaires varie, ce qui permet l'activation des programmes génétiques appropriés.

L'objectif de ma thèse doctorale était de décortiquer le complexe SCL afin d'identifier de nouveaux partenaires protéiques et de mettre en lumière de nouveaux mécanismes régulant le système hématopoïétique. Dans la première partie de ma thèse, j'ai purifié les complexes SCL des érythrocytes, puis analysé leur composition par spectrométrie de masse. J'ai ainsi pu identifier le co-répresseur transcriptionnel ETO2. J'ai démontré que le ratio stœchiométrique des activateurs/co-répresseur (SCL/ETO2) liés sur la chromatine détermine l'état d'activation transcriptionnelle d'un gène-cible. L'association d'ETO2 au complexe SCL lui permet de restreindre l'expression des gènes associés à la différenciation, tels que la glycophorine A et l'hémoglobine-alpha. ETO2 réprime aussi des gènes de prolifération, comme *p21* et *Gfi-1b*, deux inhibiteurs du cycle cellulaire. Au cours de la différenciation, les ratios d'ETO2 dans les complexes activateurs diminuent, permettant l'activation des programmes génétiques et la différenciation terminale accompagnée d'un arrêt prolifératif. En somme, ETO2 gouverne la transition prolifération/différenciation de la lignée érythrocytaire.

L'effet d'ETO2 sur la prolifération des cellules érythrocytaires m'a directement conduit à la deuxième partie de ma thèse, où j'ai exploré son rôle dans l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques. J'ai constaté que la surexpression d'ETO2 induit fortement leur auto-renouvellement, essentiellement en bloquant leur potentiel de différenciation vers toutes les lignées. La cellule souche ne peut alors plus amorcer sa différenciation, impliquant que chaque division cellulaire entraîne un doublement de la population souche et crée ainsi une congestion cellulaire importante, vue l'ampleur de l'expansion engendrée. ETO2 représente un des rares facteurs identifiés capable de produire une expansion d'une telle envergure des cellules souches.

L'identification et la caractérisation de ETO2 m'ont permis d'aborder deux thèmes fondamentaux de l'hématopoïèse, mais aussi de la biologie développementale: 1) la coordination de la prolifération et de la différenciation cellulaire et 2) l'auto-renouvellement des cellules souches. La combinatoire des complexes transcriptionnels est à la base de la régulation de l'expression génique et la découverte de nouveaux partenaires, comme ETO2, apporte un nouvel éclairage à des phénomènes biologiques encore incompris, mais qui auront de répercussions majeures dans les thérapies utilisant les cellules souches.

**Mots-clés :** Hématopoïèse, Transcription, SCL, ETO2, érythropoïèse, cellule souche, auto-renouvellement

## Abstract

The hematopoietic system is composed of multiple cell types required to accomplish its numerous functions. From a molecular point of view, hematopoietic transcription factors are crucial regulators of diversity. By spatiotemporally directing genes expression pattern, they determine cellular behaviours and functions. Transcription factors form dynamic multi-protein complexes that provide flexibility and adaptability for the hematopoietic system. Complexes nucleated by the SCL/TAL1 hematopoietic transcription factor are a gold standard model for studying dynamic combinatorial interaction. SCL is an essential regulator of hematopoiesis, affecting mainly stem cells and erythrocytes. In order to activate or repress target gene expression, SCL interacts with multiple partners, including E2A, GATA-1, LMO2 and LDB1. Depending on the cellular context, partner combinations are variable, allowing for the appropriate gene program activation or repression.

The main goal of my PhD thesis was to perform a qualitative global analysis of SCL-containing complexes to highlight new mechanisms governing hematopoietic system. During the first part of my thesis, I have purified SCL complexes from erythrocytes, and analysed them by mass spectrometry. I then identified the co-repressor ETO2. I have shown that stoichiometric ratio of activator/co-repressor (SCL/ETO2) bound on chromatin determines the transcriptional output of a given SCL-target gene. ETO2 interaction with SCL complexes diminished the expression of differentiation genes (glycophorin A and globin-alpha), as well as anti-proliferation genes, like the cell cycle inhibitors *p21* and *Gfi-1b*. During differentiation, ETO2 ratio within SCL complex is diminished, relieving transcriptional repression, allowing thus proliferation cessation and terminal differentiation to occur. Thereby, ETO2 governs the transition of proliferation to differentiation in the erythroid lineage.

The ETO2 proliferation effect on erythroid progenitor led me toward the second part of my thesis, in which I investigated the role of ETO2 in stem cell self-renewal. I have observed that the overexpression of ETO2 greatly favours self-renewal, mainly by

preventing stem cell differentiation potential. In this context, stem cells can not initiate differentiation process, resulting in the doubling of the stem cell population for each cell division and exceeding the bone marrow niche capacity. ETO2 constitutes one of the very few identified factor stimulating a stem cell expansion of this magnitude.

ETO2 identification and characterization have allowed me to explore two central themes of hematopoiesis, but also of developmental biology: 1) the coordination of proliferation and differentiation, and 2) stem cell self-renewal. The combinatorial of transcription complexes represents the very basis of gene expression regulation and the discovery of new partners, like ETO2, brings on new hopes for stem cell based-therapy.

**Keywords:** Hematopoiesis, Transcription, SCL, ETO2, Erythropoiesis, Stem cell, Self-renewal.

Résumé.....	i
Abstract .....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures .....	xii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xvii
Avant-propos.....	xix
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Survol du système hématopoïétique et de son développement .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Ontogénie.....	2
1.1.2 Homéostasie du système hématopoïétique .....	4
<b>1.2 Le facteur de transcription SCL.....</b>	<b>7</b>
1.2.1 La polyvalence de SCL .....	8
1.2.1.1 SCL et les leucémies T .....	8
1.2.1.2 Le rôle de SCL dans la formation de l’hémangioblaste et de la cellule souche hématopoïétique.....	10
1.2.1.3 SCL est requis pour l’érythropoïèse .....	11
<b>1.3 Les complexes SCL sont dynamiques et engendrent la diversité des programmes génétiques.....</b>	<b>12</b>
1.3.1 La structure protéique de SCL et des protéines E.....	13
1.3.2 Les complexes SCL dans la cellule érythrocytaire .....	15
1.3.2.1 La naissance du modèle pentamérique: le cœur du complexe .....	15
1.3.2.2 Les gènes-cibles érythrocytaires du complexe pentamérique.....	17
1.3.2.2.1 La glycophorine A (GPA).....	17



1.3.2.2.2	Les autres gènes érythrocytaires régulés par SCL .....	17
1.3.3	La cellule souche hématopoïétique .....	20
1.3.3.1	Le gène-cible <i>c-kit</i> .....	20
1.3.3.2	AML1 : un autre gène-cible du complexe .....	23
1.3.3.3	<i>Gata-2</i> , <i>Scl</i> et <i>Fli-1</i> .....	25
1.3.4	Le complexe SCL et l'hémangioblaste .....	25
1.3.5	Le complexe SCL et l'angiogénèse .....	26
1.3.6	Leucémies T .....	27
1.3.6.1	Le complexe SCL inhibe la fonction des protéines E .....	28
1.3.6.2	Les gènes-cibles des complexes SCL dans les leucémies .....	30
1.3.6.2.1	RALDH-2 .....	30
1.3.6.2.2	Les gènes de différenciation thymique .....	31
1.3.7	Les mécanismes de régulation utilisés par le complexe SCL .....	33
1.3.7.1	Auto-régulation et régulation croisée .....	33
1.3.7.1.1	La régulation transcriptionnelle .....	33
1.3.7.1.1.1	L'auto-régulation et la régulation croisée .....	33
1.3.7.1.1.2	Le motif de l' <i>input</i> multiple (MIM) .....	34
1.3.7.1.2	Régulation post-traductionnelle .....	36
1.3.8	Modification de la chromatine par le recrutement de co-activateurs et répresseurs .....	37
1.3.8.1	Le complexe SCL et sa fonction possible de répresseur global .....	39
1.3.8.2	E2A recrute principalement des co-activateurs .....	39
1.3.8.3	Comment les co-facteurs sont-ils recrutés au complexe ? .....	40
<b>1.4</b>	<b>La famille ETO .....</b>	<b>41</b>
1.4.1	L'expression ubiquitaire de la famille ETO .....	42
1.4.2	Les domaines conservés des protéines ETO .....	45
1.4.3	La famille ETO et les facteurs de transcription .....	48
1.4.4	Les protéines ETO et le cancer .....	51
1.4.4.1	ETO et la leucémie .....	51

1.4.4.2	Signalisation et AML1-ETO.....	52
1.4.4.3	ETO2 et le cancer du sein .....	53
1.4.5	Rôles physiologiques connus des protéines ETO .....	54
1.4.5.1	Système gastro-intestinal .....	54
1.4.5.2	Adipogénèse.....	55
1.4.5.3	Hématopoïèse.....	55
1.4.5.4	Le rôle de la protéine NERVY dans le développement neuronal et mécano-sensoriel. 56	
1.4.6	La polyvalence de la famille ETO .....	57
<b>1.5</b>	<b>Objectifs .....</b>	<b>58</b>
<b>1.6</b>	<b>Références .....</b>	<b>59</b>
<b>2</b>	<b>ETO2 COORDINATES CELLULAR PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION DURING ERYTHROPOIESIS .....</b>	<b>82</b>
<b>2.1</b>	<b>Contribution des co-auteurs.....</b>	<b>84</b>
<b>2.2</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>85</b>
<b>2.3</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>86</b>
<b>2.4</b>	<b>Results .....</b>	<b>89</b>
2.4.1	ETO2 is part of a nuclear TAL-1-containing complex in erythroid cells.....	89
2.4.2	ETO2 is associated with E2A in TAL-1-containing nuclear complexes.....	91
2.4.3	The ratio of activator to repressor determines the transcriptional output of the TAL-1 complex during erythroid differentiation.....	91
2.4.4	Overexpression of ETO2 represses the expression of endogenous TAL-1 target genes during erythroid differentiation .....	95
2.4.5	Inhibition of ETO2 expression accelerates the onset of expression of TAL-1 target genes during terminal erythroid differentiation .....	97

2.4.6	ETO2 regulates the Epo-dependent proliferation of erythroid cells and the expansion of human erythroid progenitors .....	99
<b>2.5</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>103</b>
2.5.1	ETO2 acts as a repressor of TAL-1 target genes .....	103
2.5.2	The dynamics and stoichiometry of the TAL-1 complex during erythroid differentiation.....	104
2.5.3	Cell differentiation versus cell proliferation: implications in leukemias.....	105
<b>2.6</b>	<b>Materials and Methods.....</b>	<b>107</b>
<b>2.7</b>	<b>Acknowledgments .....</b>	<b>110</b>
<b>2.8</b>	<b>References .....</b>	<b>111</b>
<b>2.9</b>	<b>Supplementary data.....</b>	<b>118</b>
<b>3</b>	<b>ETO2 PREVENTS MULTI-LINEAGE DIFFERENTIATION AND PROMOTES SELF-RENEWAL IN HSC .....</b>	<b>121</b>
<b>3.1</b>	<b>Contribution des co-auteurs.....</b>	<b>123</b>
<b>3.2</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>124</b>
<b>3.3</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>125</b>
<b>3.4</b>	<b>Results .....</b>	<b>127</b>
3.4.1	ETO2 is expressed in HSC-enriched population and down-regulated in early myeloid progenitors .....	127
3.4.2	ETO2 promotes in vitro expansion of fetal liver HSC .....	129
3.4.3	ETO2 represses multi-lineage differentiation and expands primitive populations.....	132

3.4.4	ETO2 influences HSC self-renewal and inhibits the generation of early progenitors .....	138
3.4.5	ETO2 does not affect cell cycle distribution or apoptosis .....	143
<b>3.5</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>145</b>
3.5.1	ETO2 increases the HSC pool size mainly by preventing differentiation .....	145
3.5.2	ETO2 prevents lymphoid differentiation by blocking E protein function .....	146
3.5.3	Other regulators associated with differentiation and self-renewal .....	147
3.5.4	ETO2 and leukemia .....	147
<b>3.6</b>	<b>Material and Methods .....</b>	<b>149</b>
<b>3.7</b>	<b>References .....</b>	<b>153</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>157</b>
<b>4.1</b>	<b>Les complexes SCL/ETO2 dans l'érythropoïèse .....</b>	<b>159</b>
4.1.1	Identification de nouveaux partenaires aux fonctions variées .....	159
4.1.1.1	Les protéines E et les complexes SCL .....	159
4.1.1.2	Les modificateurs de la chromatine et les autres protéines nouvellement identifiées .....	160
4.1.1.3	L'identification de ETO2, un co-répresseur affectant plusieurs sphères hématopoïétiques .....	162
4.1.1.4	ETO2 gouverne la différenciation et la prolifération des cellules érythrocytaires.....	165
4.1.1.5	L'occupation d'ETO2 aux promoteurs diminue avec la différenciation ....	167
4.1.1.6	La répression par ETO2 : un modèle d'échange ou de ratios stoechiométriques ? .....	168
<b>4.2</b>	<b>ETO2 et les cellules souches .....</b>	<b>169</b>
4.2.1	Perspectives : démontrer qu'ETO2 affecte réellement les cellules souches...	170

4.2.2	ETO2 et les voies potentielles pour promouvoir l'auto-renouvellement.....	171
4.2.2.1	SCL et GATA-1 .....	172
4.2.2.2	C/EBP- $\alpha$ .....	173
4.2.2.3	E2A/HEB .....	173
4.2.2.4	Notch1 et Wnt.....	174
4.2.2.5	p21.....	175
4.2.2.6	GFI-1 et GFI-1b .....	177
4.2.2.7	Une attaque sur tous les fronts .....	178
<b>4.3</b>	<b>Références .....</b>	<b>181</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>188</b>
	<b>Annexe I : Purification de complexes SCL par la méthode du TAP-TAG.....</b>	<b>189</b>
	<b>Annexe II : La surexpression d'ETO2 induit une diminution des niveaux protéiques de SCL.....</b>	<b>190</b>
	<b>Annexe III : L'expansion des cellules souches provoquée par ETO2 est amoindrie dans un fond génétique nul pour p21.....</b>	<b>191</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1-I. Les facteurs formant le complexe pentamérique et leurs fonctions dans le développement hématopoïétique normal et pathologique .....	16
Tableau 1-II. Nomenclature de la famille ETO utilisée dans la littérature .....	41

## Liste des figures

Figure 1-1. La cellule souche dans tous ses états.....	5
Figure 1-2. Division symétrique et asymétrique de la cellule souche .....	7
Figure 1-3. SCL régule plusieurs fonctions du système hématopoïétique.....	9
Figure 1-4. Structure globale des bHLH.....	14
Figure 1-5. Modèle pentamérique du complexe SCL dans l'activation de gènes érythrocytaires.....	19
Figure 1-6. Le complexe SCL peut activer ou réprimer <i>c-kit</i> en fonction de ses partenaires et du contexte cellulaire .....	22
Figure 1-7. Formation du complexe SCL sur la région <i>enhancer</i> +23 d' <i>Aml1</i> .....	24
Figure 1-8. L'expression de SCL, LMO2 et des protéines E au cours du développement normal des thymocytes .....	29
Figure 1-9. Les complexes SCL retrouvés dans les cellules leucémiques.....	32
Figure 1-10. Les réseaux de type MIM.....	35
Figure 1-11. Expression de la famille ETO dans des tissus et cellules humaines. ....	44
Figure 1-12. Structure protéique de la famille ETO et de la fusion AML1-ETO.....	46
Figure 1-13. Réseau d'interaction protéique de la famille ETO.....	50
Figure 2-1. TAL-1/ETO2 interaction in erythroid cells.....	90
Figure 2-2. ETO2 and known TAL-1 partners bind the GPA promoter and ETO2 represses the transcriptional activity of TAL-1 on this promoter.....	92
Figure 2-3. Stoichiometry of ETO2 and TAL-1 binding to the GPA promoter during erythroid differentiation. ....	94
Figure 2-4. ETO2 overexpression inhibits the expression of TAL-1 target genes. ....	96
Figure 2-5. The relative amount of ETO2 in the TAL-1-containing complex determines the timing of expression of TAL-1 target genes. ....	98
Figure 2-6. Gfi-1b and p21 are direct targets of the TAL-1/ETO2 complex during erythroid differentiation.....	100
Figure 2-7. ETO2 regulates the proliferation of erythroid progenitors.....	102
Figure S 2-1. ETO2 is associated with TAL-1 in MEL cell nuclear extracts.....	118

Figure S 2-2.....	119
Figure S 2-3.....	120
Figure 3-1 <i>Eto2</i> expression in HSC and progenitor populations. ....	128
Figure 3-2. ETO2 overexpression in fetal liver cells expands the KSL population and progenitors with high proliferative potential at the expense of differentiated cells....	131
Figure 3-3. ETO2 overexpression in mouse bone marrow cells.....	133
Figure 3-4. ETO2 specifically expands the HSC (KSL) pool without affecting progenitors (CFU) in vitro .....	134
Figure 3-5. ETO2 overexpression in bone marrow cells blocks differentiation and promotes HSC expansion in transplantation assays. ....	137
Figure 3-6. ETO2 promotes HSC self-renewal and prevents early differentiation. ....	142
Figure 3-7 The expansion of HSC mediated by ETO2 is not associated with change in proliferation, or apoptosis. ....	144
Figure 4-1. Interaction des réseaux protéiques ETO2 et SCL .....	164
Figure 4-2. ETO2 régule la prolifération et la différenciation des cellules érythrocytaires	166
Figure 4-3. ETO2 bloque la différenciation et stimule l'auto-renouvellement. ....	179



## Liste des abréviations

Ac	<i>achaete</i>
AGM	Aorte-Gonade-Mésonephros
AKAP	<i>A kinase Anchoring Protein</i>
AML	<i>Acute Myeloid Leukemia</i>
bHLH	<i>basic-Helix-Loop-Helix</i>
BMP-4	<i>Bone Morphogenic Protein-4</i>
CASTing	<i>Cyclic Amplification and Selection of Targets</i>
ChIP	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i>
CLP	<i>Common Lymphoid Progenitor</i>
CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i>
Da	<i>Daughterless</i>
EEGS	<i>E box-E box-GATA-SATB1 sites</i>
EKLF	<i>Erythroid Krüppel-Like factor</i>
ES	<i>Embryonic Stem cell</i>
ETO2	<i>Eight-to-Twenty-one 2</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FOG	<i>friend of GATA</i>
CML	<i>Chronic Myeloid Leukemia</i>
GMP	<i>Granulocyte and Macrophage Progenitor</i>
GPA	glycophorine A
GPB	glycophorine B
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis</i>
INF- $\beta$	interféron-beta
LCR	<i>Locus Control Region</i>
LDB1	<i>LIM-Domain-Binding factor 1</i>
LIN	<i>Lineage</i>

LMO	<i>Lim-Only</i>
LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i>
LTC-IC	<i>Long Term Culture-Initiating Cell</i>
MIM	<i>Multiple Input Motif</i>
MEP	<i>Megakaryoid and Erythroid Progenitor</i>
NHR1-4	<i>Nervy Homology Region 1-4</i>
P/CAF	<i>p300/Core Binding Protein-Associated factor</i>
pRB	protéine du rétinoblastome
PKA	<i>cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP)-Dependent Protein Kinase</i>
RADLH2	<i>Retinoic Acid Dehydrogenase 2</i>
RHD	<i>Runt Homology Domain</i>
SAGA	<i>Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase</i>
SATB1	<i>special AT-rich sequence binding protein 1</i>
Sc	<i>Scute</i>
SCL	<i>Stem Cell Leukemia</i>
SLAM	<i>Signaling Lymphocyte Activation Molecule</i>
SLN	Signal de localisation nucléaire
SOP	<i>Sensory Organ Precursor</i>
Sp-PA	splanchnopleure para-aortique
SSDP	<i>Sequence-Specific Single-Stranded DNA Binding Protein</i>
T-ALL	<i>T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
TAF110	<i>TATA-Binding protein Associated Factor</i>
TAP-TAG	<i>Tandem Affinity Purification-TAG</i>

*À mes enfants Philémon, Mathias, et Ophélie;  
que votre curiosité vous conduise vers de grands projets!*

## Remerciements

Je désire d'abord remercier ma directrice de thèse Trang Hoang pour ses idées novatrices, sa grande disponibilité et sa passion pour la recherche. Jamais je n'ai douté de l'intérêt qu'elle vouait et voue encore à mon projet.

Je ne peux passer sous silence la contribution de mes collègues qui ont, par leurs conseils judicieux ou leurs commentaires hilarants, étoffé mes résultats et égayé mes journées au laboratoire. Je tiens particulièrement à souligner l'apport de Mathieu Tremblay, Marie-Claude Sincennes, Sabine Herblot et Benoit Grondin. Merci pour votre aide tant technique qu'intellectuelle et pour votre sens de l'humour débordant. Mathieu, je vais m'ennuyer de nos dîners dehors...

Fonder une famille tout en continuant mes études n'aurait certainement pas été possible sans les encouragements soutenus de mon chum Pierre-Alexandre. Merci d'être dans ma vie et d'avoir su m'insuffler la force de continuer quand je croyais que tout allait s'écrouler. J'ai bien profité de tes conseils de statisticien, biologiste et amoureux. Sans toi, je n'aurais jamais pu continuer ce projet d'envergure. Notre vie remplie d'enfants, de voyages, et de quelques « petites rénos » m'a permis de relativiser les obstacles et d'y voir plus clair.

Bien sûr, mes enfants Philémon, Mathias et ma petite Ophélie m'ont pris temps et énergie tout au long de cette aventure. En retour, ils m'ont donné beaucoup plus : rires et câlins au pouvoir anti-dépresseur sans limite. Je vous remercie et vous aime pour tous ces moments qui teintent ma vie de rose et donnent un sens à tout ce que j'accomplis. J'emporte avec moi chaque matin l'image de votre sourire et le son de vos rires.

Je tiens aussi à remercier mes parents qui, chacun à leur façon, m'ont permis d'accomplir ce projet. Ma mère, Diane, fervente militante des études à vie, m'a toujours encouragée à continuer. Ayant elle-même entrepris un doctorat à 50 ans, je l'admire et crois

à l'authenticité de ses propos. Quant à mon père, Jacques, il m'a inculqué la persévérance, une qualité requise pour les épreuves de longue distance. J'ai de bons souvenirs de nos escapades à vélo. Ça m'a aidé à pédaler plus fort lors d'ascension des côtes PhDiennes...Merci à vous deux de m'avoir toujours tant aimée!

Pour toi Cathou, quelque part entre le Japon et les Territoires du Nord-Ouest, entre ton doctorat et tes projets pour sauver la planète, je te dis merci de m'avoir énergisée si souvent et c'est maintenant à mon tour de t'encourager pour la suite de ton doc et de ta famille...

Finalement, je tiens à remercier les organismes subventionnaires ayant cru en mes capacités et ma valeur d'étudiante-chercheure : Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), aux Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (NATEQ), aux l'Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) et à l'Institut National du Cancer du Canada (INCC).

## Avant-propos

L'information contenue dans le génome est codée sous forme d'ADN, qui doit être ensuite transcrit en ARN, puis traduit en protéines. La lecture de ce code se fait différemment selon les types cellulaires, permettant la grande diversité fonctionnelle des cellules composant un organisme. L'étape de la transcription est cruciale à cette spécificité puisqu'elle établira quels ARN messagers seront produits, déterminant ainsi le phénotype cellulaire voulu. La régulation transcriptionnelle est en quelque sorte à la base de la diversité cellulaire, dont les facteurs de transcription en sont les principaux acteurs. Les facteurs de transcription déterminent quels gènes seront activés ou réprimés dans le contexte spatio-temporel approprié. Les facteurs de transcription lient directement l'ADN, en plus d'interagir avec plusieurs autres protéines, afin de générer des complexes multi-protéiques. Cette variabilité d'interaction permet la formation de plusieurs complexes aux propriétés spécifiques et contribue grandement à la diversité biologique. À ce jour, quelques complexes ont été décrits dans la littérature scientifique, mais il reste beaucoup à faire avant d'avoir une meilleure vue d'ensemble de tous les complexes transcriptionnels et toutes les variations possibles.

Les complexes multi-protéiques nucléés par le facteur SCL constituent l'outil idéal afin d'aborder le thème de la régulation transcriptionnelle et la diversité cellulaire, qui est aussi vaste que complexe. D'abord, le facteur de transcription SCL est essentiel au développement du système hématopoïétique, un système tissulaire des mieux caractérisé. Étant donné la nature fluide du sang et de la moelle osseuse, l'isolation et la purification de ses différentes composantes cellulaires se font déjà depuis plusieurs décennies. Plusieurs anomalies du système hématopoïétique sont directement causées par le mauvais fonctionnement de facteurs transcriptionnels. De plus, la perte de fonction de ces facteurs compromet l'équilibre du système hématopoïétique. SCL fait partie de plusieurs complexes multi-protéiques agissant dans des contextes cellulaires variés; au niveau des leucémies T, des cellules méga-érythrocytaires et des cellules souches. L'étude des complexes SCL

hématopoïétiques représente donc le modèle idéal afin de poursuivre mes recherches sur la régulation transcriptionnelle et la diversité fonctionnelle cellulaire.

La purification *in vivo* de ces complexes et leur analyse en spectrométrie de masse m'ont conduite à l'identification de la protéine ETO2, un co-répresseur transcriptionnel. Mes recherches ont mis en lumière un nouveau mécanisme de contrôle de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs érythrocytaires, ainsi que de l'auto-renouvellement des cellules souches. L'approfondissement de nos connaissances sur la régulation transcriptionnelle hématopoïétique contribue à notre compréhension globale du développement des autres tissus et néoplasies. Mes recherches doctorales sur la transcription s'inscrivent dans cette grande ligne de pensée.

## **INTRODUCTION**



Avant d'exposer mes résultats, il importe d'introduire des concepts pivots de l'hématopoïèse et de la régulation transcriptionnelle par les complexes SCL. Je débiterai donc par un survol du système hématopoïétique et de ses différents stades de développement. J'enchaînerai avec une présentation détaillée du facteur de transcription SCL dans la différenciation des érythrocytes et la biologie des cellules souches, en insistant sur l'importance des complexes multi-protéiques. J'en profiterai pour faire une analyse exhaustive des différents complexes décrits dans la littérature permettant la grande diversité du système hématopoïétique. La régulation transcriptionnelle requiert indubitablement la modulation de l'état de la chromatine, afin de la rendre accessible à la machinerie de l'ARN polymérase. Toutefois, les mécanismes de recrutement des enzymes de modifications de la chromatine par les facteurs de transcription n'ont pas encore été élucidés. Les protéines de la famille ETO représentent des candidats intéressants puisqu'elles sont des plateformes de recrutement de modificateurs de la chromatine, en plus de lier les facteurs de transcription. Je finaliserai donc mon premier chapitre par une description détaillée de cette famille émergente dans l'étude de la régulation transcriptionnelle.

## **1.1 Survol du système hématopoïétique et de son développement**

### **1.1.1 Ontogénie**

Le développement des cellules hématopoïétiques est étroitement lié à celui des cellules endothéliales. Elles proviennent d'un précurseur commun, appelé l'hémangioblaste ou l'endothélium hémogénique, selon qu'il soit retrouvé dans le sac vitellin ou la région AGM dans l'embryon. Bien que ces précurseurs cellulaires n'aient jamais été isolés dû aux difficultés techniques inhérentes à la faible quantité de matériel disponible à ce stade du développement, plusieurs évidences *in vitro* et *in vivo* appuient leur existence [revu dans (Park et al., 2005)]. Au cours de la gastrulation, les hémangioblastes émergent de la couche ventrale du mésoderme et donnent ensuite naissance aux cellules endothéliales et hématopoïétiques détectées dans les îlots sanguins du sac vitellin au jour

7.5 E. L'hématopoïèse primitive dériverait de l'hémangioblaste, tandis que l'hématopoïèse définitive proviendrait de l'endothélium hémogénique (hémangioblaste définitif). La relation existant entre ces deux types d'hémangioblastes n'est pas claire et il pourrait s'agir en fait de la même cellule ayant migré du sac vitellin vers la région de l'AGM et ayant acquis de nouvelles propriétés, suggérant l'origine commune de l'érythropoïèse primitive et définitive.

Le développement du système hématopoïétique s'effectue en deux vagues se chevauchant spatio-temporellement: l'hématopoïèse primitive et définitive. L'hématopoïèse primitive a lieu dans le sac vitellin, un tissu extra-embryonnaire, et ne comprend que trois types cellulaires; les érythroblastes nucléés, les mégakaryocytes et les macrophages primitifs. Chez la souris, ces cellules primitives sont détectables dès le jour 7.5 post-coït (Palis and Yoder, 2001; Baron, 2001), tandis que ces cellules n'apparaissent environ qu'à la troisième semaine de gestation chez l'humain (Peault et al., 2002). Les cellules dérivant de l'hématopoïèse primitive apparaissent d'abord dans les structures extra-embryonnaire (îlots sanguins du sac vitellin), puis dans l'embryon lui-même (région Spl-P AGM) dès le jour 8.25, une fois le cœur en fonction (Jones et al., 2002; McGrath et al., 2003).

L'hématopoïèse définitive procurera toutes les cellules des lignées lymphocytaires, myelocytaires et méga-érythrocytaires retrouvées chez l'adulte. Tout comme les cellules primitives, les premières cellules définitives apparaissent d'abord dans le sac vitellin (Yoder et al., 1997), mais aussi dans l'embryon lui-même, plus précisément dans la splanchnopleure para-aortique (Sp-PA) aux jours 8.5-9.5 p.c.t. (Cumano et al., 1996; Godin and Cumano, 2002). Il y a donc un chevauchement spatio-temporel des deux types d'hématopoïèse au niveau du sac vitellin. Aux jours 10.5-11.5, les cellules définitives sont localisées dans la région aorte-gonade-mésonephros (AGM) de l'embryon (Medvinsky and Dzierzak, 1996). Les cellules transiteront ensuite vers le foie fœtal qui devient la source majeure de cellules hématopoïétiques jusqu'à peu de temps avant la naissance. La moelle osseuse deviendra ensuite le principal site d'hématopoïèse tout au long de la vie. Toutes les

lignées cellulaires retrouvées dans le sang dérivent de la cellule souche hématopoïétique de la moelle osseuse.

### 1.1.2 Homéostasie du système hématopoïétique

La cellule souche hématopoïétique est à la base du système hématopoïétique et doit être maintenue dans un état d'équilibre strict permettant à la fois la production suffisante de cellules matures de courte durée de vie et la conservation d'un nombre suffisant de cellules souches, afin de répondre à la demande en cellules matures pour toute la durée de vie. Elle oscille donc constamment entre différents états de survie et de différenciation représentés à la Figure 1-1. L'intégration de signaux intrinsèques et extrinsèques va la pousser vers des réponses positives de survie et de maintien (auto-renouvellement) et des réponses négatives la conduisant vers l'inactivité cellulaire (quiescence et apoptose) ou la différenciation [revu par (Akala and Clarke, 2006)]. La différenciation est associée avec une perte progressive du potentiel prolifératif. Ainsi, toute l'énergie de la cellule sera canalisée dans l'acquisition des fonctions spécifiques à sa lignée.

Bien que les cellules souches aient un potentiel prolifératif élevé, la majorité des cellules souches résident dans un état de quiescence, c'est-à-dire dans la phase  $G_0$  du cycle cellulaire (Fleming et al., 1993; Gothot et al., 1997; Leemhuis et al., 1996; Randall and Weissman, 1997). Le maintien de cet état de quiescence est essentiel pour protéger le pool de cellule souche d'une extinction prématurée (Mauch et al., 1995; Hodgson et al., 1982). Selon le modèle de succession clonale élaboré par Kay (KAY, 1965), les cellules souches sortant de l'état de quiescence ne pourraient pas retourner en arrière et seraient donc condamnées à une mort certaine par différenciation ou apoptose. Ce modèle de succession implique donc une suite, un remplacement constant des cellules souches nourrissant le compartiment des cellules matures. Le modèle de stabilité clonal stipule plutôt que la population de cellule souche est très dynamique et peut, une fois activée en  $G_1$ , retourner à l'état de quiescence (McKenzie et al., 2006).

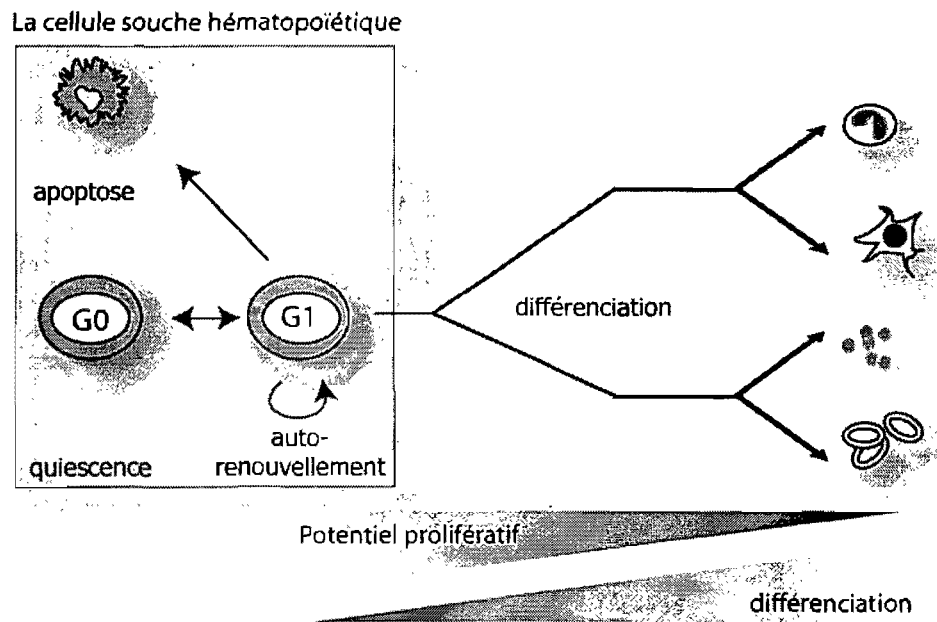


Figure 1-1. La cellule souche dans tous ses états

La plupart des cellules souches hématopoïétiques résident en phase  $G_0$  du cycle cellulaire. Cet état de quiescence permet de protéger le pool de cellules souches d'un épuisement prématuré. Lorsque les cellules s'activent et entrent en  $G_1$ , elles peuvent alors soit entrer vers un processus de mort (apoptose), s'auto-renouveler ou s'engager vers la différenciation. Au cours de la différenciation, elle perdra son potentiel prolifératif au profit de sa spécialisation fonctionnelle.

Deux options s'offrent aux cellules souches engagées dans la division cellulaire: la différenciation ou l'auto-renouvellement. L'auto-renouvellement est une caractéristique propre aux cellules souches et garantit l'intégrité du système hématopoïétique pour la durée de vie de l'organisme. L'auto-renouvellement permet la production d'au moins une cellule-fille identique à la cellule-mère, conservant ainsi la source du système. La Figure 1-2 illustre les différents scénarios observés lors de la division de la cellule souche : la division symétrique générant deux cellules souches ou celle générant deux progéniteurs, et la division asymétrique générant un progéniteur et une cellule souche. Ce dernier type de

division conduira à un auto-renouvellement de maintien, puisqu'il y a d'une part maintien du nombre de cellule souche et d'autre part production d'une cellule engagée dans la différenciation. Dans le cas d'une division symétrique vers deux cellules en différenciation, il y aura une perte nette de cellule souche. Si deux cellules-filles identiques à la cellule mère sont produites, il y a un auto-renouvellement dit d'expansion. Au cours du développement, l'auto-renouvellement d'expansion a lieu au niveau du foie fœtal afin d'établir le nombre de cellules souches nécessaires à toute la durée de vie de l'organisme. Par contre, dans la moelle osseuse, il s'agit plutôt d'un auto-renouvellement de maintien qui permet l'homéostasie tout au long de la vie adulte. En situation de stress (irradiation de la moelle osseuse, leucémies), l'auto-renouvellement d'expansion peut aussi avoir lieu dans la moelle osseuse.

À cause de leur fonction qui s'étend sur une longue période (i.e., la durée de vie de l'organisme), les cellules souches sont plus résistantes à l'apoptose que d'autres types cellulaires [revu par (Iannolo et al., 2007)]. En effet, les cellules souches et progéniteurs CD34+ expriment des niveaux plus élevés de survivine que les cellules engagées vers la différenciation (CD34-) et les cellules mononucléaires du sang (Fukuda and Pelus, 2001). La survivine est un membre de la famille des IAP (*inhibitor of apoptosis*), impliquée dans les fonctions anti-apoptotiques, la division cellulaire et le contrôle du cycle cellulaire (Li et al., 1999; Suzuki and Shiraki, 2001). La diminution de l'expression de la survivine en fonction du degré de maturation cellulaire pourrait donc expliquer la réduction de la protection anti-apoptotique liée à la différenciation cellulaire.

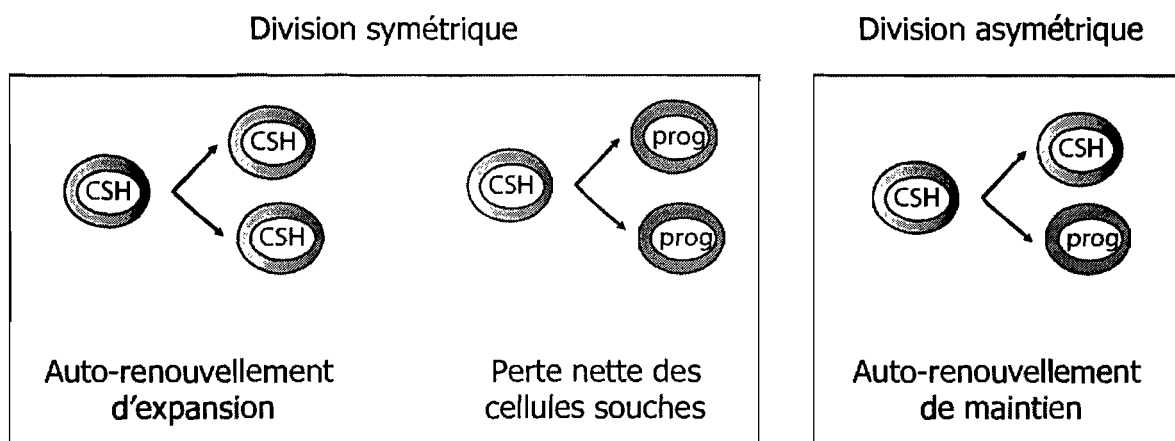


Figure 1-2. Division symétrique et asymétrique de la cellule souche

La cellule souche peut se diviser selon trois scénarios : 1) la division symétrique génère deux cellules filles souches identiques, menant à une expansion de ce pool; 2) la division symétrique peut aussi engendrer deux progéniteurs, résultant en une perte nette de cellules souches et 3) la division asymétrique permet l'auto-renouvellement de maintien.

## 1.2 Le facteur de transcription SCL

Le facteur de transcription SCL fait partie de la famille des HLH («Helix-Loop-Helix»). Contrairement au HLH de classe A dont l'expression est ubiquitaire, SCL est exprimé spécifiquement au niveau des systèmes hématopoïétique, endothélial et neuronal (Kallianpur et al., 1994; Elefanty et al., 1999; Green et al., 1992; Drake et al., 1997; Drake and Fleming, 2000). Ses fonctions au sein du système neuronal commencent à peine à être connues. Toutefois, ses rôles au niveau du système hématopoïétique sont clairement établis, bien que de nouvelles fonctions restent à découvrir. Plus spécifiquement, SCL est exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques et les précurseurs pluripotents primitifs (Brady et al., 1995; Hoang et al., 1996; Lacombe et al., 2008), dans les cellules CD34+, les mastocytes et les mégakaryocytes, (Brady et al., 1995; Pulford et al., 1995; Mowthorn et al.,

1993) ainsi que dans les cellules érythrocytaires matures (Hoang et al., 1996; Aplan et al., 1992). Ce patron d'expression hémato-spécifique est en accord avec la multitude de rôles qu'exerce SCL, aussi bien dans les cellules souches que les cellules différenciées du système hématopoïétique.

## **1.2.1 La polyvalence de SCL**

### **1.2.1.1 SCL et les leucémies T**

Le facteur de transcription SCL a d'abord été identifié chez un patient leucémique présentant la translocation t(1;14). Cette translocation provoque l'expression aberrante de SCL dans les thymocytes, un type cellulaire ne l'exprimant normalement pas [revu par (Begley and Green, 1999)]. D'autres modifications génétiques engendrant l'activation anormale de SCL dans les thymocytes ont par la suite été rapportées : translocations avec d'autres chromosomes, délétions interstitielles et mutations. Globalement, l'activation de SCL aurait lieu dans plus de 60% des cas de T-ALL humain (Bash et al., 1995). Cette grande prévalence lui suggère un rôle important dans le développement des leucémies T, mais aussi comme régulateur de l'hématopoïèse normale. Des analyses de perte et de gain de fonctions ont confirmé son caractère essentiel pour l'hématopoïèse normale [revu par (Lecuyer and Hoang, 2004)]. En outre, SCL est requis pour la formation de l'hémangioblaste, le développement des cellules souches, l'angiogénèse et le développement de la lignée érythrocytaire (voir Figure 1-3).





### 1.2.1.2 Le rôle de SCL dans la formation de l'hémangioblaste et de la cellule souche hématopoïétique

Chez la souris, l'ablation génétique de *Scl* entraîne la mort embryonnaire causée par une absence de cellules sanguines primitives et définitives (Shivdasani et al., 1995; Robb et al., 1995; Robb et al., 1996; Porcher et al., 1996). Ce défaut peut être corrigé par l'expression ectopique de *Scl* avant l'initiation de l'hématopoïèse (Porcher et al., 1996), démontrant le caractère essentiel de SCL pour l'établissement du système hématopoïétique à partir du mésoderme. SCL est aussi important pour l'établissement de l'hématopoïèse définitive puisque des cellules embryonnaires souches (ES) *Scl*<sup>-/-</sup> injectées dans des blastocytes contribuent à la formation de tous les tissus de l'organisme, sauf à ceux des lignées hématologiques (Robb et al., 1996; Porcher et al., 1996). Les souris *Scl*<sup>-/-</sup> présentent aussi des défauts angiogéniques (Visvader et al., 1998; Shivdasani et al., 1995), suggérant l'implication de SCL pour l'angiogénèse et le développement de l'hémangioblaste. Des études de gain-de-fonction complémentaire dans le poisson zèbre et *Xenopus* mettent aussi en relief le rôle essentiel de SCL dans la formation de l'hémangioblaste (Gering et al., 1998; Mead et al., 1998; Liao et al., 1998).

Afin d'outrepasser la létalité embryonnaire engendrée par la perte de SCL, la création de souris avec ablation conditionnelle a permis d'évaluer son rôle une fois le système hématopoïétique formé (Mikkola et al., 2003; Curtis et al., 2004). Les analyses des phénotypes murins démontrent très peu de différence de la capacité de repopulation des cellules *Scl*<sup>-/-</sup> comparativement aux cellules sauvages, suggérant que SCL n'est pas requis pour le maintien des cellules souches. Cependant d'autres études démontrent et supportent le rôle de SCL dans le maintien des cellules souches. D'abord, l'analyse détaillée du patron d'expression de SCL dans des cellules de moelle osseuse a révélé une forte expression dans les cellules souches, qui s'atténue dans les progéniteurs (Lacombe et al., 2008). La surexpression de SCL dans les cellules humaines CD34<sup>+</sup> (progéniteurs) augmente leur potentiel d'initiation de culture à long terme (LTC-IC) (Ravet et al., 2004); un potentiel associé avec les cellules souches et les progéniteurs immatures *in vitro*. De plus,

l'utilisation d'un dominant négatif de SCL (équivalent indirect d'une perte de fonction de SCL par la délétion de son domaine de liaison à l'ADN) inhibe ses capacités de repopulation dans des souris irradiées (Kunisato et al., 2004; Brunet de la et al., 2006), suggérant un rôle essentiel pour SCL dans le maintien des cellules souches. Tout récemment, Lacombe *et al.* démontrent clairement le rôle essentiel de SCL dans le maintien des cellules souches par des analyses de repopulation à long terme avec des cellules haplo-insuffisantes pour SCL (Lacombe et al., 2008). Les études qui n'ont pu mettre en valeur la fonction de SCL dans le maintien des cellules souches ont probablement été réalisées sur une trop courte période de temps, évaluant ainsi l'effet sur les progéniteurs plutôt que sur les cellules souches (Mikkola et al., 2003; Curtis et al., 2004).

### 1.2.1.3 SCL est requis pour l'érythropoïèse

Au cours du développement, l'ARNm *Scl* est exprimé au niveau des cellules érythrocytaires primitives et définitives des îlots sanguins du sac vitellin et au niveau du foie fœtal (Elefanty et al., 1999; Kallianpur et al., 1994; Pulford et al., 1995). Il est fortement exprimé dans les progéniteurs érythrocytaires (BFU-E et CFU-E), tandis que son expression est atténuée dans les cellules en différenciation terminale (Brady et al., 1995; Hoang et al., 1996; Kallianpur et al., 1994). La surexpression de SCL dans les lignées cellulaires hématopoïétiques et dans la moelle osseuse ont mis en lumière ses capacités de promouvoir le développement de la lignée érythrocytaire (Aplan et al., 1992; Elwood et al., 1998; Hoang et al., 1996; Valtieri et al., 1998). De plus, des études de récapitulation génétique (*genetic rescue*) et de perte conditionnelle de SCL ont clairement démontré le caractère essentiel de SCL pour la différenciation érythrocytaire *in vivo* (Hall et al., 2003; Mikkola et al., 2003; Sanchez et al., 2001). SCL est donc requis pour la formation de la lignée érythrocytaire comme en témoigne son patron d'expression et les études de perte et de gain de fonction.

### 1.3 Les complexes SCL sont dynamiques et engendrent la diversité des programmes génétiques

Le système hématopoïétique comprend une multitude de types cellulaires et de stades de différenciation, allant de l'hémangioblaste aux cellules matures sanguines (voir Figure 1-3). Cette grande diversité est régie par des programmes génétiques spécifiques à chaque type ou état cellulaire. Toute modification du destin cellulaire passe nécessairement par des changements du programme génétique, dont les facteurs de transcription hématospécifiques en sont les principaux régulateurs. L'importance des facteurs de transcription dans la diversité génétique est bien illustrée par l'analyse inter-espèces des génomes. Il a été suggéré que la complexité biologique des espèces ne correspond pas au nombre de gènes d'une espèce donnée, mais plutôt à la quantité de patron d'expression mis en place [revu par (Levine and Tjian, 2003)]. La régulation transcriptionnelle et les facteurs de transcription sont donc au cœur de cette complexité. Plusieurs réseaux de facteurs transcriptionnels sont impliqués dans l'établissement de la diversité de l'expression génétique du système hématopoïétique (Loose et al., 2007). Bien que peu de facteurs de transcription régulent cette organisation, leur nature combinatoire permet une régulation fine et offre la versatilité requise pour le maintien de la diversité [revu par (Orkin, 2000)]. Les facteurs de transcription favorisent un environnement propice ou hostile à l'activation génique en interagissant et en recrutant des enzymes capables de modifier la chromatine et de rapprocher les éléments en cis (*enhancers* et promoteurs) de l'ADN.

Le facteur de transcription SCL/TAL-1 fait partie de complexes multi-protéiques jouant plusieurs rôles au sein du système hématopoïétique. Les activités biologiques de SCL découlent de sa structure modulaire, lui permettant d'interagir avec d'autres protéines et de lier l'ADN. L'activité transcriptionnelle de SCL passe obligatoirement par le recrutement d'un complexe multi-protéique compétent pour agir sur la transcription (Lecuyer and Hoang, 2004). Ces complexes dynamiques, dont la composition varie, régulent positivement ou négativement une multitude de gènes-cibles en fonction du

contexte cellulaire et constituent donc un modèle dans l'étude de la régulation transcriptionnelle hématopoïétique.

### 1.3.1 La structure protéique de SCL et des protéines E

Les activités biologiques de SCL reposent principalement sur deux domaines de la protéine : son domaine HLH et son domaine basique (voir Figure 1-4). Le domaine HLH permet l'homo et l'hétérodimérisation aux membres de la famille des HLH. Ce domaine est crucial pour l'hétérodimérisation de SCL avec les membres de la famille des protéines E, une sous-famille des protéines HLH composée des facteurs E2A (isoformes E47 et E12), E2-2 et HEB. Elles sont exprimées ubiquitairement et représentent les principales partenaires de SCL. Afin de lier directement l'ADN, SCL doit interagir avec les protéines E.

Le domaine basique permet quant à lui la liaison de SCL à l'ADN sur des sites consensus appelés boîtes E (CANNTG), préférentiellement 5'-AACAGATGGT-3' (Hsu et al., 1994a). La liaison à l'ADN sur les boîtes E requiert l'hétérodimérisation de SCL avec les protéines E. Des mutants de délétion du domaine de liaison à l'ADN de SCL ont permis de démontrer que, en fonction du contexte cellulaire, l'activité de SCL ne dépend pas toujours de sa capacité de lier l'ADN (Porcher et al., 1999; Lecuyer et al., 2002). En effet, l'activation du gène *c-kit* dans les cellules souches est indépendante de l'activité de ce domaine (Lecuyer et al., 2002), tandis que l'activation maximale du gène de la *glycophorine A* dans les érythrocytes requiert l'intégrité de ce domaine (Lahlil, Lécuyer, Herblot et Hoang, données non publiées). En absence de son domaine basique, SCL peut être amené sur place en interagissant avec un large complexe multi-protéique lui-même ancré à l'ADN par des sites GATA ou des boîtes GC (Xu et al., 2003; Lahlil et al., 2004; Lecuyer et al., 2002; Lecuyer et al., 2002). Le rôle de SCL dans les cellules souches (activation de *c-kit*) pourrait donc être en tant que facteur de nucléation du complexe SCL, plutôt qu'un facteur d'ancrage à l'ADN.

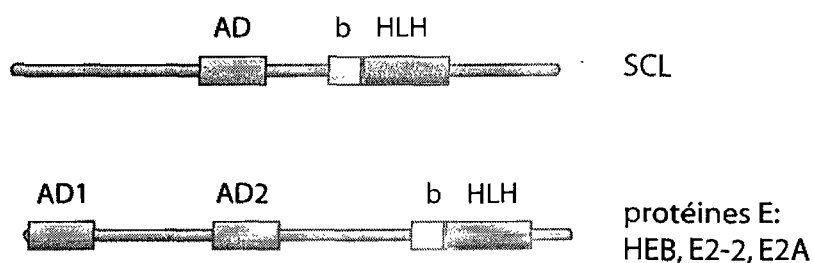


Figure 1-4. Structure globale des bHLH

Le domaine basique (b) des facteurs HLH permet la liaison à l'ADN, tandis que le domaine HLH favorise leur homo/hétérodimérisation. Les domaines AD (domaine d'activation de la transcription) sont impliqués dans le recrutement de co-activateurs et de la machinerie transcriptionnelle.

Bien que le domaine de liaison à l'ADN puisse être accessoire à la régulation de ses gènes-cibles, son hétérodimérisation avec les protéines E est absolument requise (Lecuyer et al., 2002). Les protéines E possèdent deux domaines d'activation (AD1 et AD2) de la transcription important pour recruter des co-activateurs transcriptionnels (Massari et al., 1999). SCL possède aussi un domaine de transactivation dans sa portion en N-terminal (voir Figure 1-4) (Hsu et al., 1994; Wadman et al., 1994b; Sanchez-Garcia and Rabbitts, 1994). Toutefois, aucune étude ne supporte un rôle bien défini pour ce domaine. En effet, la protéine SCL existe sous trois isoformes principales: la protéine pleine longueur de 42 KDa et deux plus courtes versions de 39 et 22 KDa (Cheng et al., 1993; Pulford et al., 1995). La protéine de 22 KDa est produite par la lecture d'un cadre alternatif de traduction qui omet le domaine de transactivation (Calkhoven et al., 2003), mais est quand même capable de réguler la transcription (Tremblay et al., 2004) et d'induire des leucémies chez la souris (Aplan et al., 1997). La liaison obligatoire de SCL avec les protéines E assurerait

donc la présence de domaines d'activation capables de recruter la machinerie transcriptionnelle.

### **1.3.2 Les complexes SCL dans la cellule érythrocytaire**

#### **1.3.2.1 La naissance du modèle pentamérique: le cœur du complexe**

Le concept du complexe SCL découle d'abord d'observations indirectes et de l'identification de quelques facteurs de transcription ayant le même phénotype que SCL lorsque mutés. Chez la souris, les pertes de fonction individuelles des facteurs de transcription LMO2 (Warren et al., 1994) et SCL (Shivdasani et al., 1995) engendrent la mort causée par des anomalies de formation de l'érythropoïèse du sac vitellin. Un blocage du développement érythrocytaire est aussi observé dans les cellules dépourvues de GATA-1 (Pevny et al., 1991; Simon et al., 1992; Orkin, 1992; Weiss et al., 1994). L'implication des facteurs GATA-1, LMO2 et SCL dans l'érythropoïèse laisse suggérer une étroite collaboration fonctionnelle. Il était aussi connu que LMO2 et SCL étaient tous deux activés par des translocations chromosomiques dans les leucémies de type T-ALL (Rabbitts, 1994), renforçant l'idée de collaboration. De plus, l'hétéro-complexe LMO2/SCL avait déjà été observé dans des cellules érythrocytaires (Valge-Archer et al., 1994; Wadman et al., 1994a). Suite à ces observations, Osada *et al.* ont démontré pour la première fois la présence de complexes multi-protéiques contenant SCL/LMO2/GATA-1 à l'aide d'immuno-précipitation d'extraits protéiques provenant de la lignée cellulaire MEL, une lignée cellulaire dérivée à partir d'une érythroleucémie murine induite par le virus de Friend (Osada et al., 1995). Toutefois, il n'existait alors aucune preuve que ce complexe liait l'ADN et activait des gènes érythrocytaires.

Des essais de CASTing (sélection *in vitro* de sites de liaison de haute affinité) avec des extraits nucléaires de cellules MEL ont permis d'isoler des séquences consensus enrichies par la liaison de LMO2 : une boîte E suivie d'un site GATA, espacés de 8-10 paires de bases (Wadman et al., 1997). Tel que présenté dans la section précédente, les

boîtes E sont les sites de liaison préférentiels pour les hétérodimères SCL/E2A. Le site GATA (XGATAR) est quant à lui directement lié par les membres de la famille du même nom. LMO2 qui ne lie pas directement l'ADN agirait donc comme un pont entre l'hétérodimère SCL/E2A et la protéine GATA-1, chacun lié à leur site respectif sur l'ADN. Indépendamment, la protéine LDB1 a été identifiée comme partenaire de LMO2 et LMO1 (Agulnick et al., 1996; Jurata et al., 1996), suggérant sa participation au complexe SCL/LMO2/GATA-1. L'utilisation de la séquence boîte E/ GATA et d'extraits protéiques érythrocytaires (essais de retardement sur gel) a permis de mettre en évidence le complexe pentamérique SCL/E2A/GATA-1/LMO2/LDB1 (Wadman et al., 1997), considéré maintenant comme le cœur du complexe SCL. Mis à part LDB1, chacun de ses membres a un rôle bien défini et essentiel dans l'hématopoïèse et le développement des leucémies, tel que présenté dans le Tableau 1-I.

Tableau 1-I. Les facteurs formant le complexe pentamérique et leurs fonctions dans le développement hématopoïétique normal et pathologique

Complexe SCL	Leucémie	Hématopoïèse normale
SCL	T-ALL	Hémangioblaste ; cellule souche ; Érythropoïèse
LMO2	T-ALL	Cellule souche ; érythropoïèse
GATA-1	AML (M7)	Lignée méga-érythrocytaire
E2A	B-ALL	Développement des cellules B et T
LDB1	—	formation d'îlots sanguins du sac vitellin

### 1.3.2.2 Les gènes-cibles érythrocytaires du complexe pentamérique

#### 1.3.2.2.1 La glycophorine A (GPA)

Le premier gène cible du complexe SCL identifié fût celui de la glycophorine A (*GpA*). La GPA fait partie de la famille des glycophorines, des protéines membranaires abondantes retrouvées en surface des érythrocytes. Les glycophorines exercent principalement des fonctions mécaniques au niveau des érythrocytes et participent à la résistance contre certains parasites, comme *Plasmodium falciparum* (Chasis and Mohandas, 1992; Chishti et al., 1996). Lors de la surexpression de SCL dans les cellules TF-1 (lignée cellulaire pouvant être induite vers les voies érythrocytaire ou monocyttaire), les niveaux de GPA augmentent de façon considérable (Hoang et al., 1996). Par la suite, l'équipe du Dr. Hoang a démontré par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) la liaison *in vivo* du complexe SCL sur le promoteur de la GPA (Lahlil et al., 2004). Le promoteur de la GPA contient deux sites GATA et une boîte E importants pour la liaison du complexe. Des essais de retardement sur gel ont permis de démontrer l'importance de SCL comme facteur de nucléation du complexe. En absence de SCL, les facteurs LMO2, GATA-1, et LDB1 et E2A ne forment qu'un complexe de faible poids moléculaire sur l'ADN. Par contre, l'ajout de SCL ou de seulement son domaine bHLH permet la formation d'un complexe de haut poids moléculaire capable de transactiver les gènes érythrocytaires. SCL est donc un important facteur de nucléation dans la formation du complexe.

#### 1.3.2.2.2 Les autres gènes érythrocytaires régulés par SCL

À l'instar des glycophorines, les protéines P4.2 exercent des fonctions de structure et de charge au niveau des érythrocytes matures et sont aussi des cibles directes de la régulation transcriptionnelle du complexe SCL (Xu et al., 2003). La région recrutant le complexe est localisée au niveau du promoteur proximal et composée de deux éléments GATA-boîte E, dont l'intégrité est essentielle pour l'activation transcriptionnelle.



Les gènes de l'alpha et de la beta-globine sont aussi des cibles du complexe SCL (Bender et al., 2000; Elnitski et al., 1997; Anguita et al., 2004). Anguita *et al* ont démontré que le complexe SCL pentamérique occupait des sites hypersensibles du LCR de l'alpha-globine et que le degré d'occupation augmentait en fonction de la différenciation cellulaire. Dans les progéniteurs érythrocytaires, l'alpha-globine n'est pas encore produite, bien que le complexe SCL soit déjà lié sur la chromatine. Le gène est alors prêt à être exprimé, mais d'autres événements sont requis afin de recruter efficacement l'ARN polymérase II et enclencher la transcription. Dans les cellules plus matures, Anguita *et al* ont démontré que l'ARN polymérase II est effectivement recrutée au niveau du promoteur, corrélant avec l'activation de l'alpha-globine (Anguita et al., 2004). La liaison du complexe SCL favorise probablement le recrutement de la polymérase en maintenant une concentration locale élevée de facteurs, établissant ainsi un environnement propice à la transcription (Tolhuis et al., 2002; Hatzis and Talianidis, 2002).

Le complexe SCL contrôle aussi la régulation de GATA-1 (Vyas et al., 1999), assurant ainsi la formation de complexes SCL compétents pour activer le programme érythrocytaire. Le facteur de transcription EKLF, essentiel à l'érythropoïèse (Coghill et al., 2001), représente une cible potentielle du complexe SCL. Le promoteur contient une séquence régulatrice composée d'un site GATA et de boîtes E fortement liés par un complexe contenant SCL/GATA-1 *in vivo* (Rodriguez et al., 2005).

Le complexe SCL régule donc l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation érythrocytaire. Il induit l'expression de la *GpA* et de *p4.2*, deux protéines de structure, l'expression des globines essentielles à la fonction de transport de l'oxygène, ainsi que l'expression d'autres facteurs de transcription importants pour l'érythropoïèse, tels GATA-1 et EKLF. Le complexe SCL active ainsi une batterie de gènes essentiels à la différenciation terminale érythrocytaire, agissant comme complexe directeur de cette lignée (voir Figure 1-5).

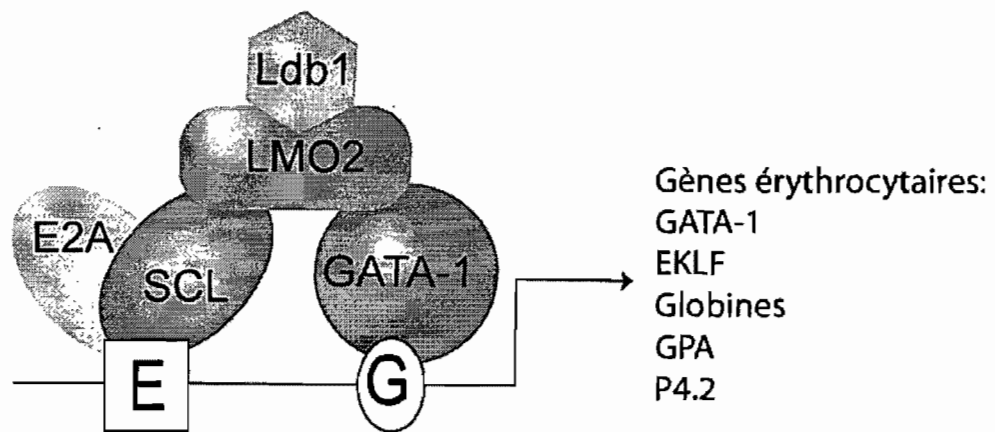


Figure 1-5. Modèle pentamérique du complexe SCL dans l'activation de gènes érythrocytaires

Les hétérodimères SCL/E2A sont recrutés aux boîtes E (E), tandis que la protéine GATA-1 se lie aux sites GATA (G). La protéine LMO2 recrute LDB1 et permet de faire le pont entre SCL et GATA. Ces complexes sont retrouvés au niveau des promoteurs proximaux, mais aussi des LCR des gènes de l'alpha et de la beta-globine.

### 1.3.3 La cellule souche hématopoïétique

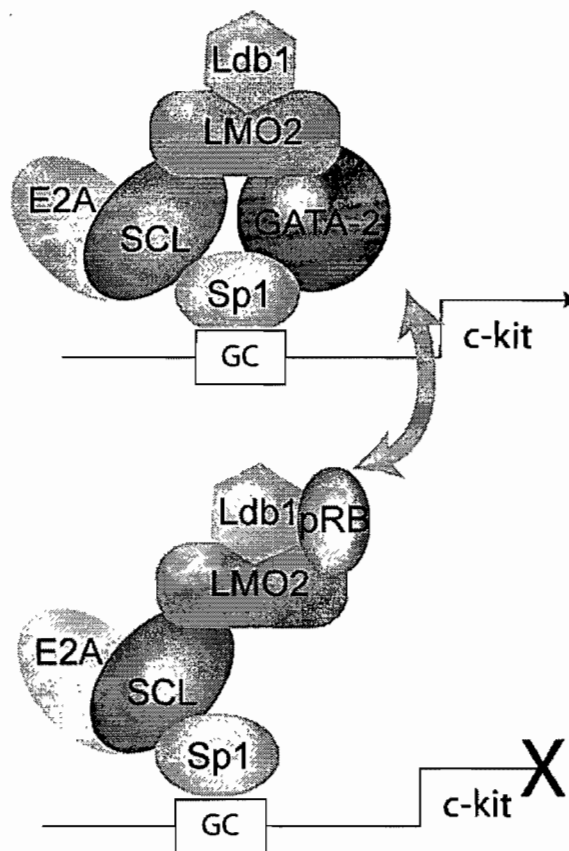
Bien que la fonction de SCL dans les cellules souches soit bien établie, l'étude des complexes SCL dans ce compartiment cellulaire est compliquée par la rareté inhérente aux cellules souches ainsi que la difficulté d'isoler des populations pures. Néanmoins, il est possible d'inférer un modèle de complexe SCL dans les cellules souches à partir du complexe pentamérique des cellules érythrocytaires, combiné aux analyse d'expression des facteurs de transcription, de gènes cibles et de co-occupation des promoteurs.

#### 1.3.3.1 Le gène-cible *c-kit*

Le récepteur tyrosine kinase C-KIT est essentiel à la prolifération, le maintien et la survie des cellules souches (Chabot et al., 1988; Thoren et al., 2008). Il constitue le premier gène-cible identifié du complexe SCL jouant un rôle au niveau des cellules souches (Lécuyer et al., 2002). Le promoteur proximal de *c-kit* ne possède ni boîte E ou site GATA susceptibles d'être liés par SCL/E2A ou les protéines GATA, mais une boîte GC, une séquence consensus liée par les facteurs SP1 de la famille des doigts de zinc. La présence de la boîte GC a permis d'identifier la protéine SP1 en tant que nouveau facteur de liaison du complexe SCL. Par des essais de retardement sur gel et des ChIP, Lécuyer *et al.* démontrent que le complexe SCL/E2A/GATA-2/LMO2/LDB1 est assemblé sur le promoteur de *c-kit* via SP1. Au niveau des cellules immatures, GATA-2 substitue à GATA-1 dans la formation des complexes SCL. Le rôle du facteur GATA-2 prédomine dans les cellules souches, tandis que GATA-1 exerce principalement ses fonctions dans les cellules érythrocytaires, corrélant avec leur patron d'expression respectif (Ohneda and Yamamoto, 2002). En transactivation transitoire, GATA-2 est plus efficace que GATA-1 pour transactiver *c-kit*, alors que pour l'activation de la *GpA*, un gène érythrocytaire, GATA-1 prévaut (Lahlil et al., 2004). Le noyau du complexe SCL dans les cellules souches diffère donc sensiblement de celui retrouvé dans les cellules érythrocytaires par la substitution de GATA-1 par GATA-2.

Il a été démontré que d'autres protéines peuvent interagir avec ce complexe. Par exemple, le recrutement de la protéine du rétinoblastome (pRB) au complexe SCL réprime l'expression de *c-kit* dans les cellules érythroblastiques (Vitelli et al., 2000), empêchant l'expression d'un gène non pertinent pour le compartiment érythrocytaire (voir Figure 1-6). En modulant la composition du complexe, la cellule peut ainsi être programmée vers la lignée érythrocytaire. Ces complexes dynamiques sont directement impliqués dans la transition de l'état prolifératif des progéniteurs (activation de *GpA* et répression de *c-kit*). Étonnamment, les protéines GATA-1 ou 2 ne feraient pas partie de ce complexe SCL/pRB. Le groupe de Orkin a déjà démontré qu'un complexe multi-protéique composé de SCL, E2A, Lmo2 et LDB1, sans GATA-2, peut s'assembler sur une seule boîte E (Visvader et al., 1997). Ces variations nous indiquent que le complexe SCL est très dynamique et que les différents partenaires déterminent l'activation ou la répression génique.

Modèle activateur des gènes associés au maintien et la prolifération des cellules souches



Modèle répresseur des gènes de prolifération dans un contexte érythroblastique

Figure 1-6. Le complexe SCL peut activer ou réprimer *c-kit* en fonction de ses partenaires et du contexte cellulaire

En présence de GATA-2, le complexe SCL active le gène *c-kit*. Par contre, la présence de pRb au sein du complexe réprime cette expression et permet à la cellule de s'engager vers la différenciation érythrocytaire par l'activation des gènes-cibles du complexe.

### 1.3.3.2 AML1 : un autre gène-cible du complexe

Outre *c-kit*, le complexe SCL régule aussi d'autres gènes importants pour la cellule souche. Récemment, des études chez le poisson zèbre ont démontré que AML1 constitue l'une des cibles de SCL (Patterson et al., 2007; Patterson et al., 2005). Le facteur de transcription AML1 gouverne l'émergence des cellules souches définitives (Okuda et al., 1996). Chez la souris, une variante du complexe pentamérique SCL a été détectée sur le gène *Aml1* (Nottingham et al., 2007). La région *enhancer* +23 contient des motifs GATA et Ets essentiels à l'expression d'*Aml1* dans les cellules souches définitives murines. Les facteurs SCL/GATA-2/LMO2/LDB1/Ets (Fli-1 en particulier) s'assemblent sur cette région, dirigeant ainsi l'expression d'*Aml1* dans les cellules souches. Cette région *enhancer* contient aussi des boîtes E, correspondant aux sites préférentiels des hétérodimères SCL/protéines E, donc un site possible d'ancrage du complexe SCL. Malheureusement, la présence de protéines E n'a pas été vérifiée sur la chromatine. Une analyse plus détaillée du promoteur et des protéines s'y liant aurait permis une meilleure définition des complexes régulant l'expression d'*Aml1*. Landry et ses collègues ont aussi mis en évidence l'existence du complexe SCL/GATA2/E47 lié in vivo sur un *enhancer* intronique de AML1 et capable d'activer sa transcription dans des essais de transactivation en transfection transitoire (Landry et al., 2008). Cette séquence activatrice dirigerait l'expression d'AML1 dans les cellules de foie fœtal et dans le sac vitellin. AML1 représente donc un gène régulé par le complexe SCL dans les cellules souches du sac vitellin et du foie fœtal. En Figure 1-7, je propose un modèle de complexe SCL établi en fonction de l'espacement des différents sites d'ancrage (motifs de liaison pour les FT) et des interactions connues entre les différentes protéines.

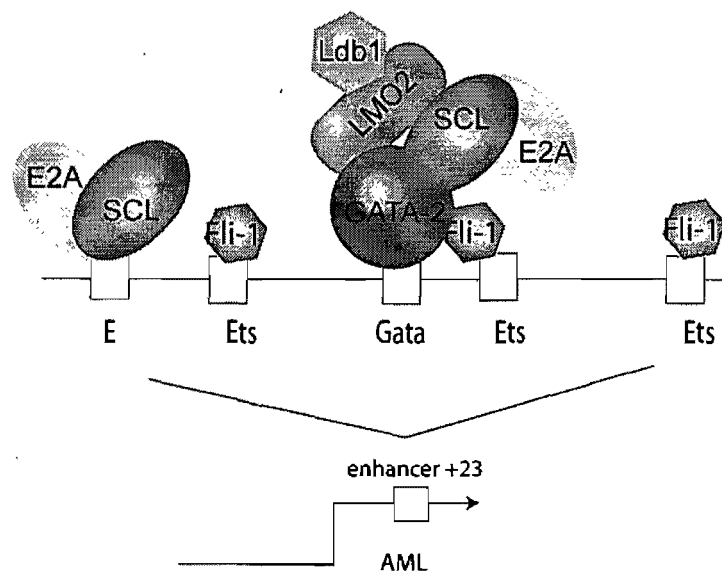


Figure 1-7. Formation du complexe SCL sur la région *enhancer* +23 d'*Aml1*

Modèle possible du complexe SCL régulant positivement l'expression d'*Aml1*. Le complexe peut être ancré par le biais des boîtes E et sites GATA situés à proximité des sites Ets.

### 1.3.3.3 *Gata-2, Scl et Fli-1*

Bien qu'il n'ait pas été mis directement en évidence, le complexe SCL/GATA-2/FLI-1 régulerait aussi d'autres gènes importants pour l'initiation de l'hématopoïèse. L'étude de Pimanda *et al.* portant sur les circuits transcriptionnels régulant l'hématopoïèse démontre que SCL, GATA-2 et FLI-1, trois facteurs essentiels de l'hématopoïèse, s'auto-régulent par l'activation de leur propre *enhancer* (Pimanda et al., 2007). En effet, les trois partenaires co-occupent leur trois *enhancers* dans des cellules fœtales isolées à partir de l'AGM. Le recrutement de FLI-1 au complexe SCL pourrait se faire par l'interaction directe GATA-2/FLI-1, déjà observée dans des cellules mégakaryocytaires (Eisbacher et al., 2003). Dans ce contexte cellulaire, FLI-1 lie les sites Ets seulement lorsque GATA-1 est lié sur les sites GATA avoisinants, favorisant la stabilité de FLI-1 sur l'ADN et suggérant l'importance de l'interaction de ces deux protéines. Le complexe FLI-1/GATA-2/SCL semble donc être un important régulateur de plusieurs gènes associés à la fonction des cellules souches : *Aml1*, *Gata-2*, *Scl* et *Fli-1*.

### 1.3.4 Le complexe SCL et l'hémangioblaste

La collaboration génétique de *Scl* et *Lmo2* durant le développement de l'hémangioblaste chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) suggère l'importance des complexes SCL dans ce compartiment cellulaire très primitif (Patterson et al., 2007). La similitude des phénotypes pour les mutants SCL et LMO2 suggère qu'ils opèrent tous deux au sein d'un complexe multi-protéique. De plus, la perte de *Scl* ne peut pas être compensée par un mutant incapable de lier LMO2, mais peut l'être par un mutant incapable de lier l'ADN, soulignant l'importance de l'interaction SCL/LMO2 pour la formation des hémangioblastes. Tel que décrit précédemment, le domaine de liaison à l'ADN n'est pas toujours requis pour la transactivation génique. Le complexe peut très bien être recruté à l'ADN via des sites GATA ou des boîtes GC.



Des expériences réalisées chez *Xenopus* ont aussi permis de mettre en évidence la formation d'un complexe SCL nécessaire à la spécification des cellules sanguines à partir du mésoderme. Les surexpressions combinées de LMO2, GATA-1 et SCL dans l'embryon induisent le développement de l'érythropoïèse primitive à partir du mésoderme. Par contre, la surexpression individuelle de SCL, GATA-1 ou LMO2 n'affecte pas le destin cellulaire du mésoderme, suggérant que ces facteurs forment un complexe multi-protéique important pour l'établissement des premières cellules sanguines (Mead et al., 2001). Le complexe SCL/GATA-1/LMO2 semble donc se retrouver dans plusieurs compartiments cellulaires, affectant l'expression d'une multitude de gènes.

### 1.3.5 Le complexe SCL et l'angiogénèse

Des études de perte et de gain de fonction ont montré que SCL est requis pour le développement vasculaire au cours de l'angiogénèse embryonnaire (Patterson et al., 2005; Gering et al., 1998; Gering et al., 2003; Porcher et al., 1999; Visvader et al., 1998). Son rôle dans l'angiogénèse post-natale est beaucoup moins défini, bien que plusieurs observations expérimentales lui suggèrent un rôle important. Premièrement, SCL est exprimé dans les nouveaux vaisseaux formés au cours de la vie adulte (Kallianpur et al., 1994; Pulford et al., 1995). Deuxièmement, la perte de fonction de SCL dans des cellules endothéliales humaines a permis de démontrer son rôle essentiel dans le remodelage des vaisseaux sanguins et d'identifier un nouveau gène-cible du complexe SCL : la *VE-cadherine* (Deleuze et al., 2007). En effet, SCL, E2A, GATA-1 et LMO2 co-occupent le promoteur de la *VE-cadherine* et induisent son expression. La liaison et l'activation de la *VE-cadherine* dépendent d'un motif GATA-boîte E, semblable à celui retrouvé dans les promoteurs des gènes érythrocytaires (voir Figure 1-5). La perte de fonction de SCL, LMO2 ou E47 inhibe l'expression de la *VE-cadherine in vivo* et entraîne des défauts morphologiques des cellules ES. En régulant l'expression de la *VE-cadherine*, le complexe SCL contribue à la fonction des cellules endothéliales. Des cribles exhaustifs afin de trouver des gènes-cibles de SCL permettront de repérer d'autres gènes orchestrés par les complexes SCL se rapportant à la fonction endothéliale.

### 1.3.6 Leucémies T

Lors de leur maturation, les lymphocytes T migrent vers le thymus où ils vont subir une succession de sélections positives et négatives afin de produire des lymphocytes T matures avec le répertoire antigénique approprié. La présence aberrante de SCL dans les thymocytes en développement interfère avec leur développement normal, favorisant l'apparition de leucémies de type T-ALL chez l'humain (Begley and Green, 1999). Afin de définir le rôle leucémogénique de SCL, plusieurs modèles de souris transgéniques exprimant SCL ont été développés (Larson et al., 1996; Kelliher et al., 1996; Condorelli et al., 1996; Aplan et al., 1997). Ces modèles ont en commun de ne provoquer l'apparition de leucémies que tardivement (9 mois) et avec une faible prévalence, suggérant l'importance des événements collaborateurs. L'expression aberrante des protéines LMO1 ou LMO2 représente l'événement collaborateur de SCL le mieux défini et documenté. Leur surexpression individuelle dans des modèles transgéniques conduit aux mêmes phénotypes de leucémies latentes et peu pénétrantes que les modèles SCL (Fisch et al., 1992; Aplan et al., 1997; Larson et al., 1994; Larson et al., 1995; McGuire et al., 1992; Neale et al., 1995). Par contre, la combinaison de LMO1 ou LMO2 et de SCL accélère l'apparition des leucémies (trois mois) avec une pénétrance de 100% (Larson et al., 1996; Aplan et al., 1997). D'ailleurs, certains cas de T-ALL humaines présentent des activations concomitantes de SCL et des protéines LMO (Wadman et al., 1994a), démontrant leur capacité d'agir en synergie.

### 1.3.6.1 Le complexe SCL inhibe la fonction des protéines E

Plusieurs modèles leucémogéniques appuient le rôle du complexe SCL à titre de répresseur des fonctions de E2A et HEB (O'Neil et al., 2004; Bain et al., 1997; Park and Sun, 1998; Herblot et al., 2000; Hansson et al., 2003; Goldfarb and Lewandowska, 1995; Hsu et al., 1994). Les protéines E sont d'importants régulateurs des cellules T [revu par (Bain and Murre, 1998)]. Les souris déficientes pour E2A ou HEB présentent une hypocellularité thymique, un blocage de la différenciation et le développement occasionnel de leucémie (Bain and Murre, 1998; Barndt et al., 1999; Kim et al., 1999; Blom et al., 1999; Bain et al., 1997). Normalement, l'expression de SCL et LMO2 décroît avec la différenciation des thymocytes, contrairement à l'expression des protéines E (voir Figure 1-8). L'expression aberrante de SCL ou des protéines LMOs n'est pas suffisante pour induire des leucémies. Par contre, leur expression concomitante favorise le développement précoce des leucémies dans les modèles murins (Larson et al., 1996; Aplan et al., 1997). Les similitudes entre les souris déficientes pour HEB et celles surexprimant SCL et LMO1 (Herblot et al., 2000) suggèrent que leur surexpression simultanée empêcherait plus efficacement la fonction des protéines E que le ferait SCL ou les protéines LMOs seules. Le groupe de Kelliher a aussi démontré que les leucémies SCL pouvaient être accélérées dans des souris hétérozygotes pour HEB et E2A (O'Neil et al., 2004). En réduisant de moitié la dose des protéines E, ils facilitent le blocage de leur fonction transcriptionnelle par SCL. Toutefois, il est important de mentionner que le groupe de Kelliher est le seul groupe ayant réussi à induire des leucémies dans des souris surexprimant SCL seul, sans les protéines LMO2. Ceci pourrait être causé par le fond génétique peu commun que ce groupe utilise et il serait bon de reproduire ces résultats avec d'autres fonds génétiques. Néanmoins, ce modèle, tout comme celui publié par l'équipe du Dr. Hoang, suggère que la perte de fonction des protéines E ne se ferait pas par leur séquestration comme le feraient les protéines Id (Norton, 2000), mais plutôt par l'inhibition active de leur fonction transcriptionnelle, tel que démontré par la liaison directe de SCL sur les dimères de

protéines E fixés à leur gène-cible, soit le promoteur du pré-T-alpha et l'*enhancer* du CD4 (Tremblay et al., 2003; O'Neil et al., 2004).

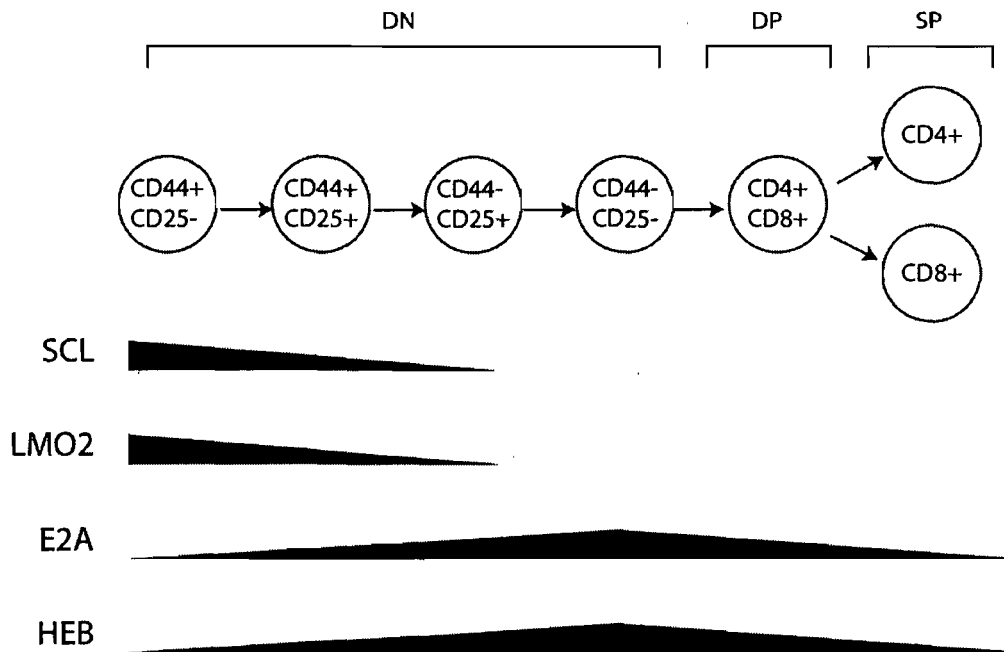


Figure 1-8. L'expression de SCL, LMO2 et des protéines E au cours du développement normal des thymocytes

Les cellules pré-T du thymus sont d'abord double négatives (DN) pour les marqueurs extracellulaires CD4 et CD8, s'en suit une sélection pour les cellules double positives (DP) CD4+CD8+, puis une sélection des cellules simple positive (SP) pour CD4 ou CD8. L'expression de SCL et LMO2 décroît avec le degré de différenciation, tandis qu'E2A et HEB augmentent. Figure adaptée de (Herblot et al., 2000).

La perte de fonction des protéines E serait donc la base mécanistique de leucémogénèse par SCL. Toutefois, plusieurs études appuient un modèle leucémogénique plus global. Une analyse de « ChIP on ChIP » combinée à l'analyse globale des gènes modulés par l'inactivation de SCL par RNAi démontre que SCL interfère avec le programme génique de la cellule T plus généralement (Palomero et al., 2006). En effet, SCL active et réprime une multitude de gènes-cibles, dont 40% ne sont pas des cibles des protéines E. Cette analyse est compatible avec la synergie observée des protéines LMOs et SCL (Herblot et al., 2000; Chervinsky et al., 1999). Lorsqu'uniquement SCL est surexprimé, plusieurs cibles seraient liées, mais l'effet transcriptionnel ne serait pas suffisamment fort pour altérer le programme génétique et induire des leucémies. L'ajout de protéines LMO faciliterait l'initiation de leucémie en reconstituant le complexe SCL/LMO2 normalement présent dans les progéniteurs hématopoïétiques et pourrait élargir le spectre des gènes-cibles affectés.

### **1.3.6.2 Les gènes-cibles des complexes SCL dans les leucémies**

#### **1.3.6.2.1 *RALDH-2***

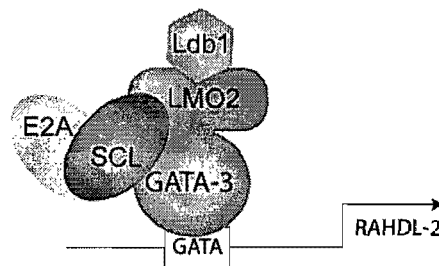
L'équipe de Ono a pu mettre en évidence la formation d'un complexe leucémique très similaire à celui retrouvé dans les cellules érythrocytaires (Ono et al., 1998). Ce complexe isolé à partir d'une lignée leucémique surexprimant SCL est composé de SCL/LMO1-2/E2A et GATA-3. GATA-3 est normalement exprimé dans les cellules T et leur précurseurs (Ho et al., 1991; George et al., 1994). En s'associant à SCL/E2A/LMO1, il permettrait l'ancrage du complexe sur le site GATA du promoteur de la *raldh-2* (voir Figure 1-9), un gène utilisé comme marqueur des leucémies T-ALL, mais dont la fonction est encore inconnue. Grütz *et al.* ont aussi détecté la présence d'un complexe similaire capable de lier l'ADN dans des cellules leucémiques, sans toutefois trouver GATA-3 (Grütz et al., 1998). La séquence de liaison utilisée était composée de deux boîtes E espacées de 10 paires de bases, sans site GATA, expliquant probablement pourquoi GATA-3 n'a pas été retrouvée.

#### *1.3.6.2.2 Les gènes de différenciation thymique*

Parmi les gènes-cibles identifiés de SCL dans les cellules leucémiques se trouvent le pré-T $\alpha$ , TCR $\beta$ , RAG2, CD4 et CD5, des gènes-cibles normalement activés par E2A/HEB et impliqués dans la différenciation cellulaire. Le groupe de Kelliher a démontré que SCL induisait des leucémies en inhibant le programme transcriptionnel de E2A et HEB par le recrutement des co-répresseurs transcriptionnels (O'Neil et al., 2004). En conditions normales, les homodimères d'E2A recrutent les co-activateurs comme p300 sur le promoteur de CD4. Par contre, en présence de SCL, les homodimères E2A sont remplacés par les hétérodimères SCL/E2A, favorisant le recrutement des deux co-répresseurs, mSin3A et HDAC1 (voir Figure 1-9). Il est fort possible que d'autres gènes de différenciation réprimés par SCL, comme le pré-T $\alpha$ , TCR $\beta$ , RAG2, et CD5, le soient aussi par le recrutement des co-répresseurs. Ce modèle est toutefois un peu simpliste. Il est connu que la protéine E2A recrute aussi des co-répresseurs de la famille ETO, interagissant elles-mêmes avec les HDACs et mSin3A (Zhang et al., 2004; Goardon et al., 2006). Le recrutement des HDACs dans le modèle leucémique pourrait donc se faire par une modification des partenaires des protéines E, plutôt que par le recrutement direct de SCL/HDAC, dont l'interaction directe n'a jamais été démontrée.

Plusieurs mécanismes d'action de SCL sont proposés afin d'expliquer cette interférence avec le programme génétique normal. Un consensus ressort toutefois des différents modèles proposés; l'induction de la leucémie par SCL, avec ou sans les protéines LMO, passe par un blocage de la différenciation. Ce blocage est aussi retrouvé dans plusieurs types de leucémies, dont les leucémies myéloïdes aiguës (AML) demeurent l'exemple le mieux documenté (Tenen, 2003). L'expression aberrante de SCL dans les thymocytes induit la formation de complexes protéiques et affecte ainsi les programmes géniques normalement mis en place.

Modèle activateur  
des gènes associés au  
développement  
de leucémies



Modèle répresseur  
des gènes de  
différenciation

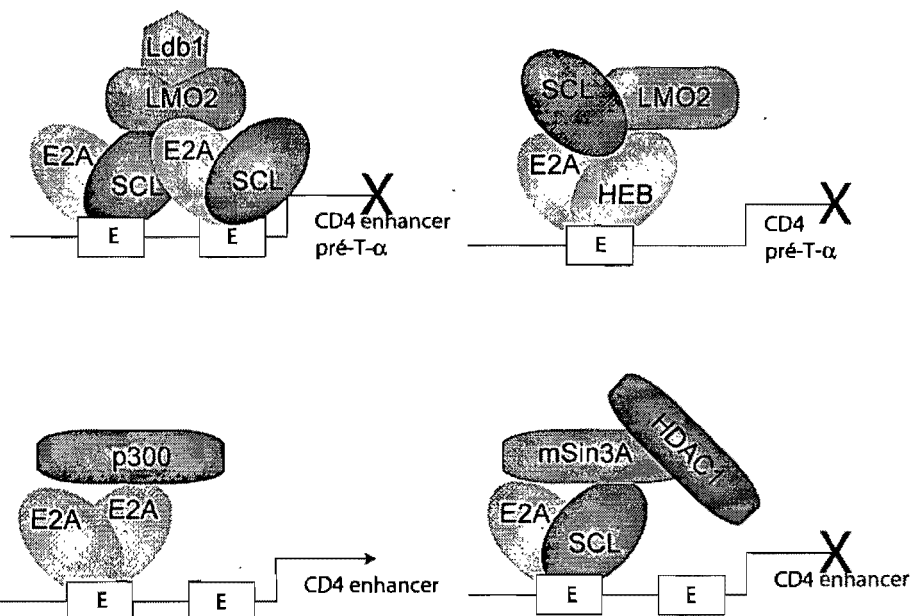


Figure 1-9. Les complexes SCL retrouvés dans les cellules leucémiques

Les complexes SCL peuvent activer ou réprimer des gènes-cibles dans les thymocytes, affectant le programme génétique normal. Le recrutement de modificateurs de la chromatine inhibe les gènes normalement activés par les homodimères E2A. Les schémas indiquent que le recrutement des co-répresseurs (mSin3A et HDACs) se fait par SCL, toutefois ces interactions directes n'ont pas été démontrées. Tel que discuté dans l'introduction, ces interactions pourraient aussi avoir lieu avec les protéines E2A et ETOs.

### 1.3.7 Les mécanismes de régulation utilisés par le complexe SCL

Les complexes nucléés par SCL sont dynamiques et retrouvés dans plusieurs contextes cellulaires. La composition du complexe est déterminante pour l'activation ou répression du programme génétique approprié. L'analyse de ces complexes dynamiques permet de faire ressortir plusieurs mécanismes de régulation utilisés par les complexes transcriptionnels.

#### 1.3.7.1 Auto-régulation et régulation croisée

##### 1.3.7.1.1 La régulation transcriptionnelle

L'analyse globale de la régulation de l'expression génique chez les bactéries et les levures a permis de mettre en relief des réseaux transcriptionnels organisés selon des motifs particuliers (Lee et al., 2002; Shen-Orr et al., 2002). La combinaison de ces motifs individuels définit le programme transcriptionnel de la cellule (Howard and Davidson, 2004). Deux motifs sont particulièrement utilisés par les complexes SCL: l'auto-régulation et le modèle de l'input multiple (MIM) (Swiers et al., 2006). La combinaison de ces types de motifs permet d'activer un ensemble de gènes requis pour un processus donné.

##### 1.3.7.1.1.1 L'auto-régulation et la régulation croisée

Le motif de l'auto-régulation ou de l'auto-régulation croisée implique qu'un facteur affecte positivement ou négativement sa propre expression ou celle d'un partenaire du complexe. Le phénomène du *GATA switch*, où la fonction de GATA-1 prend la relève de celle de GATA-2, illustre bien ce type de régulation. GATA-2 est surtout exprimé au niveau des cellules souches hématopoïétiques (Ling et al., 2004; Tsai et al., 1994; Tsai and Orkin, 1997), alors que GATA-1 ne l'est que très faiblement (Bertrand et al., 2005). Cette relation inverse entre l'augmentation des niveaux de GATA-1 et la baisse de GATA-2 est cruciale pour le bon déroulement de l'érythropoïèse (Minegishi et al., 2003; Weiss et al., 1994; Weiss et al., 1997) et découle de leur capacité d'auto-régulation. La protéine



GATA-2 active sa propre expression en liant ses séquences régulatrices (Grass et al., 2003). Par contre, en présence de GATA-1 et de son partenaire FOG (*friend of GATA*), GATA-2 est déplacée de ses propres sites de régulation (Pal et al., 2004; Grass et al., 2003). Dans les cellules souches, où GATA-1 n'est que très faiblement exprimé, GATA-2 l'emporte et maintient ses niveaux d'expression appropriés. Par contre, GATA-1 vient réprimer l'expression de GATA-2 lorsque la cellule s'engage vers la différenciation méga-érythrocytaire. Le processus par lequel GATA-1 arrive à renverser l'équilibre en sa faveur n'est pas très bien défini. Selon le modèle de la stochastique (Hoang, 2004), l'expression de GATA-1 augmenterait aléatoirement dans une population donnée des cellules souches, les engageant vers la voie méga-érythrocytaire. À partir du moment où l'expression de GATA-1 est suffisante pour inhiber celle de GATA-2, de nouveaux complexes transcriptionnels avec SCL se forment et régulent ainsi de nouveaux programmes génétiques.

L'auto-régulation et la régulation croisée du complexe SCL est aussi pertinente pour diriger l'expression de SCL par la liaison de ses multiples *enhancers* (Gottgens et al., 2000; Sinclair et al., 1999). L'*enhancer* situé en 3' du gène *Scl* est essentiel à l'expression de SCL dans les cellules hémangioblastiques, les cellules souches et endothéliales (Sanchez et al., 2001). Cet *enhancer* est lié par la triade SCL/FLI-1/GATA-2, qui lie aussi les régions régulatrices de GATA-2 et FLI-1 (Gottgens et al., 2002). Ce complexe s'auto-alimente et renforce le programme associé à l'établissement et au maintien des cellules souches hématopoïétiques.

#### 1.3.7.1.1.2 Le motif de l'*input* multiple (MIM)

Le motif MIM définit la régulation d'un ensemble de gènes-cibles par le même groupe de facteurs de transcription. Ce mécanisme de contrôle procure une régulation fine des programmes génétiques, où l'activation maximale a lieu seulement lorsque tous les régulateurs sont présents. Ce type de motif pourrait expliquer le phénomène du *multi-lineage priming* des cellules souches. Les cellules souches expriment de faibles niveaux de

gènes associés aux différentes lignées cellulaires (Ivanova et al., 2002). Selon le modèle du MIM, l'activation maximale de ces gènes de lignées et la différenciation subséquente dépendent de la présence simultanée des facteurs de transcription impliqués dans le motif. Au fur et à mesure que les facteurs s'accumulent au cours de la différenciation, l'expression des cibles peut augmenter et favoriser la différenciation vers une lignée précise. Les complexes SCL illustrent bien le MIM (voir Figure 1-10). Tel que vu précédemment, les complexes SCL régulent l'activité d'une batterie de gènes associés à la fonction érythrocytaire. Les facteurs SCL, E2A, LDB1 et LMO2 sont communs à toutes les cibles. Les différences entre l'expression des cibles peuvent être expliquées par la substitution de GATA-1 ou GATA-2 au complexe et l'inclusion des facteurs de transcription NF-E2 ou SP1, seulement impliqués dans l'activation ou la répression de certains gènes et souvent requis pour l'activation maximale (Anguita et al., 2004)

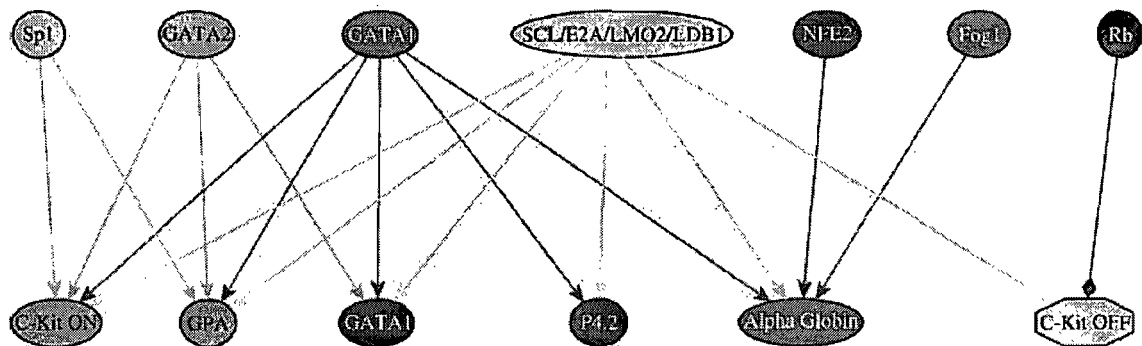


Figure 1-10. Les réseaux de type MIM.

Réseau transcriptionnel érythrocytaire des facteurs retrouvés dans les complexes SCL. Certains régulateurs sont communs à tous les gènes-cibles et ont donc des propriétés de MIM (SCL, E2A, LMO2 et LDB1). Les protéines GATA-1 et GATA-2 alternent pour l'activation des gènes, tandis que certains facteurs, comme NF-E2, ne participent qu'à l'activation de certains gènes (globine-alpha). La couleur grise représente l'inactivation transcriptionnelle, tandis que toutes les autres couleurs indiquent l'activation. Figure tirée intégralement de (Swiers et al., 2006).

Le principe du MIM recoupe le concept du « tout ou rien » ou de la « détection de coïncidence » observés dans les complexes transcriptionnels et les *enhanceosomes* (complexes de facteurs de transcription liés aux séquences *enhancers*). Le concept de la détection de coïncidence représente un paradigme central dans la régulation de la transcription (Hartwell et al., 1999). L'*enhanceosome* de l'interféron-beta (INF- $\beta$ ) en est le prototype (Carey, 1998; Merika and Thanos, 2001). Cet *enhancer* démontre une réponse hautement spécifique à l'infection virale, une propriété ne pouvant être reproduite par les constituants individuels de l'*enhancer*. L'effet biologique représente donc plus que la somme des parties et requiert l'intégration de plusieurs signaux afin d'être produit. La présence de chacun est requise afin d'assembler un tout cohérent. Cette obligation d'être présent pour tous les membres du complexe permet l'activation ou la répression des programmes génétiques en respect des impératifs biologiques du moment.

#### 1.3.7.1.2 Régulation post-traductionnelle

Bien que les fonctions de SCL soient associées à la régulation de l'expression génétique, une étude récente lui révèle un nouveau rôle dans la stabilisation protéique de LMO2 (Lecuyer et al., 2007). Les auteurs démontrent d'abord que la protéine LMO2 est la cible de dégradation du protéosome et, qu'en présence de SCL ou de MG132 (inhibiteur du protéosome), LMO2 n'est plus dégradée. L'utilisation du mutant M13 de SCL, incapable de lier LMO2, démontre que l'interaction directe SCL/LMO2 est requise afin de permettre cette protection et l'assemblage du complexe. La régulation post-transcriptionnelle opérée par SCL permet de protéger LMO2 de la dégradation et ainsi s'assurer du bon ratio SCL/LMO2 des complexes SCL. L'étude des complexes multi-protéiques contenant LDB1 a aussi pu mettre en lumière un phénomène semblable. La dégradation de LDB1 contrôlerait la stœchiométrie des complexes au cours du développement (Ostendorff et al., 2002; Xu et al., 2007; Hiratani et al., 2003), supportant l'idée que la dégradation contrôlée de certains facteurs régule la formation et la stœchiométrie des complexes.

Similairement à l'effet protecteur de SCL sur LMO2, les protéines HEB et E2A stabilisent les niveaux protéiques de SCL (Desrosiers et al., 2008). Cette stabilisation implique une interaction directe des protéines qui inhiberait la dégradation de SCL. D'ailleurs le même phénomène de stabilisation chez myoD, un autre facteur bHLH, est observé par sa liaison directe avec E2A (Lingbeck et al., 2005). Il semble donc que les facteurs de transcription exercent leur régulation en allant bien au-delà de la transcription, mais en utilisant aussi des mécanismes de contrôle post-traductionnel, via des interactions protéiques directes.

### **1.3.8 Modification de la chromatine par le recrutement de co-activateurs et répresseurs**

L'organisation de la chromatine est régulée de façon dynamique et est un déterminant essentiel de l'activité transcriptionnelle (Forsberg and Bresnick, 2001; Neely and Workman, 2002; Fischle et al., 2003; Smith and Peterson, 2005). En fonction de l'état de compactage de la chromatine, le recrutement de facteurs de transcription et de la machinerie transcriptionnelle basale sera plus ou moins efficace. La structure de la chromatine doit être suffisamment relâchée pour permettre la liaison des facteurs de transcription. L'action de co-activateurs, des enzymes capables d'ouvrir la chromatine, va permettre aux facteurs de transcription de lier l'ADN qui, à leur tour, vont recruter des co-activateurs ou des co-répresseurs. Ces co-facteurs agissent essentiellement en modifiant de façon covalente les histones ou en affectant directement la structure de la chromatine par l'hydrolyse de l'ATP. Par exemple, le complexe SWI/SNF peut déplacer les histones et relâcher la chromatine, facilitant ainsi l'ancrage de l'appareil transcriptionnel (Roberts and Orkin, 2004). Les co-facteurs peuvent aussi altérer de façon covalente la queue en N-terminal des histones. Parmi les modificateurs covalents, on retrouve les acétylateurs et les désacétylateurs des histones (HAT et les HDAC), ainsi que les méthylases et déméthylases (CARM1 et LSD1, par exemple). L'ajout et le retrait de ces groupements chimiques établissent une signature ou un code qui dictera quels gènes seront activés. Des études extensives chez les mammifères et organismes inférieurs ont permis de révéler le code de

modification des histones à la base de la régulation épigénétique (Strahl and Allis, 2000; Jenuwein and Allis, 2001). Par exemple, des faibles niveaux d'acétylation (hypoacétylation) des histones et la méthylation de l'histone H3 (H3-K9) sont associées à des régions plus condensées de la chromatine et à l'inactivation génique (Rea et al., 2000; Eissenberg and Elgin, 2000). Par contre, une augmentation des niveaux d'acétylation est associée avec l'activation transcriptionnelle (Strahl and Allis, 2000; Jenuwein and Allis, 2001).

Parmi les enzymes de modification les mieux caractérisées, les enzymes d'acétylation et de désacétylation des histones (HAT et les HDAC), ainsi que la famille des co-répresseurs des récepteurs nucléaires (NCoR, SMRT et Sin3A) sont d'un intérêt certains pour l'étude des complexes SCL puisqu'ils y ont été trouvés associés (Huang et al., 1999; Huang and Brandt, 2000; Huang et al., 2000; O'Neil et al., 2004). Le groupe de Brandt affirme que l'interaction de SCL et de Sin3A se fait de façon directe. Toutefois son approche expérimentale (co-immuno-précipitations et *GST-pulldown* à partir de protéines non purifiées) ne permet pas de confirmer si cette interaction est directe (Huang and Brandt, 2000). D'ailleurs, aucun autre groupe n'a pu confirmer ces résultats. Le recrutement de co-répresseur aux complexes SCL pourrait se faire par des protéines encore non identifiées.

Une fois recrutés à l'ADN par les complexes transcriptionnels, les co-facteurs peuvent s'assembler entre-eux et ainsi créer un environnement très hostile ou favorable à la transcription. Par exemple, les co-répresseurs NCoR et SMRT interagissent avec des sous-complexes contenant des HDACs et d'autres enzymes associées à la répression transcriptionnelle (Underhill et al., 2000; Li et al., 2000; Guenther et al., 2001; Zhang et al., 2002; Yoon et al., 2003). Ces échafaudages de complexes répresseurs arrivent ainsi à exercer une répression sévère pour un locus donné.

### **1.3.8.1 Le complexe SCL et sa fonction possible de répresseur global**

Au cours d'une recherche de gènes-cibles de SCL, une séquence contenant des boîtes E, des sites de liaison GATA et SATB1 (région EEGS) a été identifiée dans la région péricentromérique de plusieurs chromosomes (Wen et al., 2005). Étant donné que cette région est associée avec la formation de l'hétérochromatine et l'inactivation génique (Choo, 2001), SCL pourrait bien être impliqué dans la régulation globale de la structure de la chromatine. Les auteurs proposent un nouveau complexe incluant SABL1, un recruteur d'enzymes capable de modifier les histones, et Suv39H1, une méthyltransférase des histones. Ce complexe lie les séquences EEGS et réprime l'activité transcriptionnelle. En présence d'un inhibiteur de désacétylase d'histone, la répression exercée par le complexe SCL est empêchée, suggérant que la répression du complexe SCL se fait via la désacétylation des histones, et donc le recrutement de protéines capables de modifier la structure de la chromatine.

### **1.3.8.2 E2A recrute principalement des co-activateurs**

Évidemment, les interactions avec les co-répresseurs sont dynamiques, ce qui permet la réactivation d'un locus sur demande. Par exemple, les complexes SCL des cellules érythrocytaires en différenciation perdent progressivement leur interaction avec les répresseurs HDAC1 et mSin3A, au détriment de l'acquisition de p300 (Huang and Brandt, 2000; Huang et al., 1999; Huang et al., 2000). Cette grande flexibilité du complexe SCL est, entre autre, attribuable à E2A et HEB, deux partenaires capables de lui fournir des interactions avec des co-activateurs et potentiellement des co-répresseurs.

Les protéines E2A et HEB sont généralement associées avec une fonction d'activateurs de la transcription. Ces fonctions dépendent de l'interaction de leur domaine AD1 avec les complexe SAGA (Massari et al., 1999) et p300/PCAF (Zhang et al., 2004), des acétylateurs d'histones associés à l'activation génique (Baker and Grant, 2007; Nagy and Tora, 2007). Toutefois, les protéines E auraient aussi des fonctions répressives. Cette propriété de réprimer la transcription provient du domaine AD1 (Markus et al., 2002). Les

mécanismes régissant cette répression n'ont pas encore été élucidés. Récemment, la protéine de fusion AML1-ETO, ayant des propriétés de co-répresseur transcriptionnel, a été identifiée comme protéine interagissant avec E2A et HEB (Zhang et al., 2004). Il est possible que cette interaction explique les effets répresseurs des protéines E. J'aborderai ultérieurement la question des co-répresseurs et de AML1-ETO.

### **1.3.8.3 Comment les co-facteurs sont-ils recrutés au complexe ?**

Les complexes transcriptionnels font donc appel à plusieurs co-facteurs afin de générer ou non un environnement propice à la transcription. Les études actuelles ne permettent pas de dire avec certitude comment les co-facteurs sont recrutés au complexe SCL. Tel que mentionné précédemment, des interactions directes ont été validées en ce qui a trait au co-activateur p300 et les protéines E (Zhang et al., 2004). Toutefois, les protéines capables de recruter les co-répresseurs HDAC et Sin3A n'ont pas encore été identifiées. Parmi les candidats intéressants, se retrouvent les protéines de la famille ETO. Leur structure modulaire agit comme une interface entre les facteurs de transcription liant l'ADN et les co-répresseurs modifiant la chromatine. La famille ETO se comporte comme une plate-forme de recrutement de co-répresseurs, capable de modifier l'état de la chromatine et donc de déterminer quels gènes seront exprimés [revu par (Rossetti et al., 2004)]. Plusieurs observations leur suggèrent un rôle important dans l'hématopoïèse. La section suivante introduit la famille ETO, leurs modes d'action et leurs rôles connus dans le développement des leucémies et le développement normal.

## 1.4 La famille ETO

La famille des co-répresseurs ETO est remarquablement bien conservée des invertébrés aux vertébrés. Chez la drosophile, la protéine NERVY représente le seul membre de cette famille (Feinstein et al., 1995). Par contre, les mammifères en sont dotés de trois: ETO, ETO2 et MTGR1 (voir Tableau 1-II. Nomenclature de la famille ETO) (Davis et al., 2003). La protéine ETO a d'abord été découverte comme partenaire de fusion avec le gène *Aml1* dans les leucémies myéloïdes chez l'humain. Son nom dérive d'ailleurs directement de cette translocation t(8 ;21) : *Eight-to-Twenty-One*. MTGR1 a été identifié ultérieurement par analogie de séquence avec ETO (Fracchiolla et al., 1998) et comme partenaire protéique de la fusion AML1-ETO (Kitabayashi et al., 1998). Quant au gène *Eto2*, il a été trouvé par clonage positionnel d'une nouvelle translocation t(16 ;21) dont le point de jonction est aussi *Aml1* (Gamou et al., 1998). ETO et ETO2 se retrouvent donc toutes deux impliquées dans des translocations chromosomiques avec le gène *Aml1*, avec pour seule différence que les translocations avec ETO surviennent dans les leucémies primaires, tandis que cellules impliquant ETO2 sont seulement retrouvées dans des leucémies secondaires, c'est-à-dire suite aux traitements des leucémies myéloïdes primaires (Gamou et al., 1998).

Tableau 1-II. Nomenclature de la famille ETO utilisée dans la littérature

Nomenclature utilisée dans la thèse	Nomenclatures alternatives
ETO	CBFA2T1; MTG8; AML1T1; ZMYND2; RUNX1T1
ETO2	CBFA2T3; MTG16; MTGR2; ZMYND4
MTGR1	CBFA2T2; EHT; ZMYND3



### 1.4.1 L'expression ubiquitaire de la famille ETO

Les membres de la famille ETO sont exprimés dans plusieurs organes et types cellulaires (Calabi and Cilli, 1998; Davis et al., 1999; Su et al., 2004). Bien que les trois protéines soient pratiquement ubiquitaires, chacune prédomine dans des organes particuliers, leur suggérant des rôles parfois redondants, parfois très spécifiques. La Figure 1-11 permet de constater l'étendue de l'expression de cette famille dans des cellules humaines. Il est primordial de noter que, étant donné l'abondance du messager ETO2 dans les cellules hématopoïétiques, les échelles des ordonnées d'ETO2, ETO ou MTRGR1 ne sont pas graduées de la même façon, donnant au premier coup d'œil la fausse impression qu'ETO2 est moins exprimée qu'ETO.

La protéine ETO est fortement exprimée au niveau du foie fœtal, du cervelet et de l'utérus, tandis que MTGR1 prédomine dans la prostate, le foie et certaines lignées leucémiques. L'expression d'ETO2 est significativement plus élevée dans le sang périphérique et la moelle osseuse. Ses niveaux y sont particulièrement importants dans les cellules dendritiques, ainsi que dans les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques CD34+. Toutes les autres lignées hématopoïétiques testées présentent des baisses d'expression d'ETO2, suggérant qu'ETO2 est un régulateur de l'hématopoïèse précoce et que ses niveaux doivent être abaissés afin de permettre la différenciation cellulaire. L'expression d'ETO dans le foie fœtal révèle aussi qu'il pourrait aussi s'agir d'un régulateur de l'hématopoïèse, mais son implication dans la différenciation est beaucoup moins évidente que pour ETO2. J'aborderai plus spécifiquement les évidences supportant un rôle pour les protéines ETO dans le système hématopoïétique dans la section traitant de l'hématopoïèse (section 1.4.5.3).

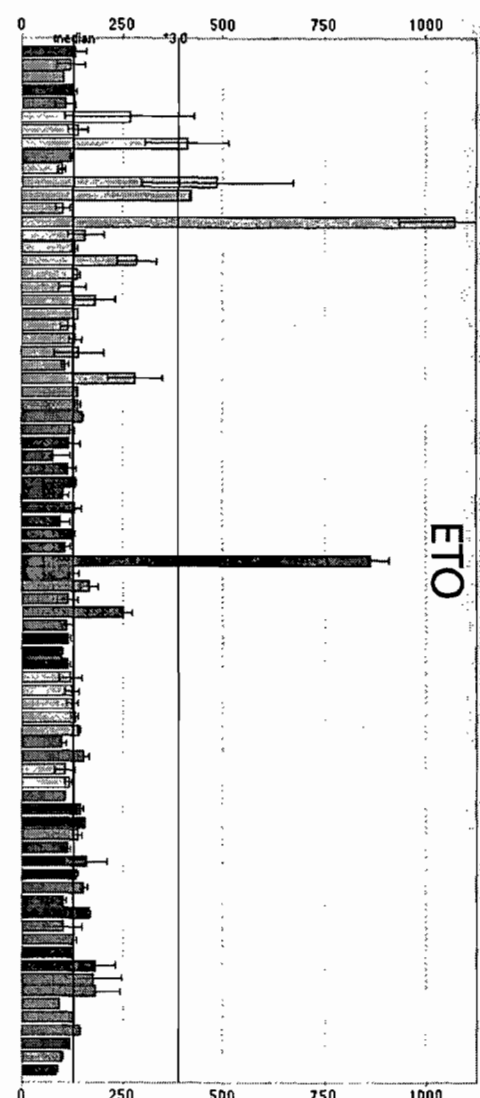
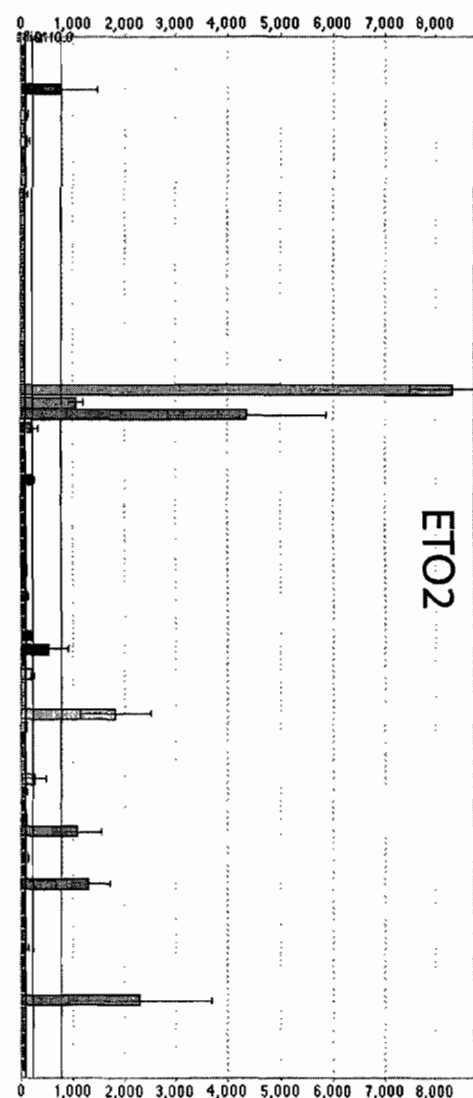
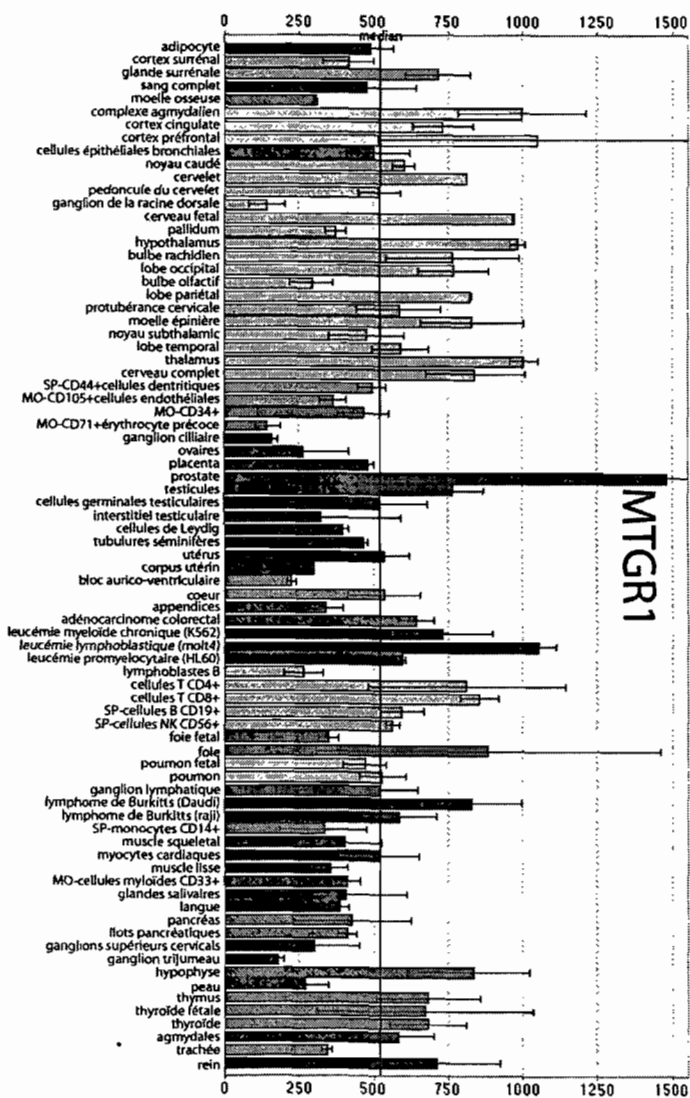


Figure 1-11. Expression de la famille ETO dans des tissus et cellules humaines.

Distribution tissulaire et cellulaire des messagers d'ETOs. L'expression des gènes est normalisée selon un algorithme standard utilisé pour traiter les données Affymetrix. Brièvement, deux pour-cent des valeurs d'intensité supérieures et inférieures sont retirés, puis une moyenne est calculée à partir des valeurs d'intensité restantes. Cette moyenne est utilisée pour normaliser l'expression dans les différents tissus. Il est important de remarquer que la gradation des axes des ordonnés pour ETO, MTGR1 et ETO2 diffère dû à la forte expression d'ETO2 dans certains tissus. La médiane (ligne horizontale noire) et ses multiples de 3 (ligne rouge) et 10 (ligne bleue) sont indiqués. Figure traduite en français à partir de (Su et al., 2004; Genomics Institute of the Novartis Research Foundation, 2008).

### 1.4.2 Les domaines conservés des protéines ETO

La famille ETO est caractérisée par quatre domaines hautement conservés (Feinstein et al., 1995; Kitabayashi et al., 1998; Davis et al., 2003). Ces domaines permettent principalement l'interaction des protéines ETO avec des modificateurs de la chromatine, ainsi qu'avec des facteurs de transcription. Ils ont été nommés NHR1-4 (NHR : *nervy homology region*), en fonction des régions conservées de la protéine NERVY (voir Figure 1-12).

Le domaine NHR1/TAF4H est homologue à TAF110/TAF4, un co-facteur essentiel de la sous-unité TFIID de l'ARN polymérase II. Il s'agit en fait de la première protéine répertoriée possédant une homologie avec une TAF. Cette caractéristique n'est certainement pas étrangère aux fonctions transcriptionnelles des protéines ETO. D'ailleurs, le domaine NHR1 est capable de recruter des protéines E et de réprimer leur activité transcriptionnelle (Zhang et al., 2004; Wei et al., 2007). Étant donné que les protéines E sont impliquées avec plusieurs facteurs de transcription, comme SCL et MyoD, il est possible que les protéines ETO puissent affecter l'expression d'une multitude de gènes-cibles. Cette hypothèse reste à confirmer par des analyses protéomiques de complexes transcriptionnels et des études fonctionnelles.

Le domaine NHR2 possède une structure en forme d'alpha-hélice importante pour l'homo ou l'hétérodimérisation des facteurs ETO entre-eux (Kitabayashi et al., 1998; Lutterbach et al., 1998a; Zhang et al., 2001) et le recrutement du co-répresseur Sin3A (Amann et al., 2001). Leur capacité de s'oligomériser permet l'échafaudage de co-répresseurs et d'ainsi potentialiser leur effet répressif. La délétion du domaine NHR2 conduit à la perte des propriétés répressives de ETO (Zhang et al., 2001) et entraîne une perte du pouvoir leucémique de AML1-ETO (Liu et al., 2006). Toutefois, il n'est pas clair si ces pertes des fonctions répressives proviennent de l'empêchement des facteurs ETO d'interagir entre-eux ou de la perte de liaison avec Sin3A ou un autre co-répresseur encore non identifié.

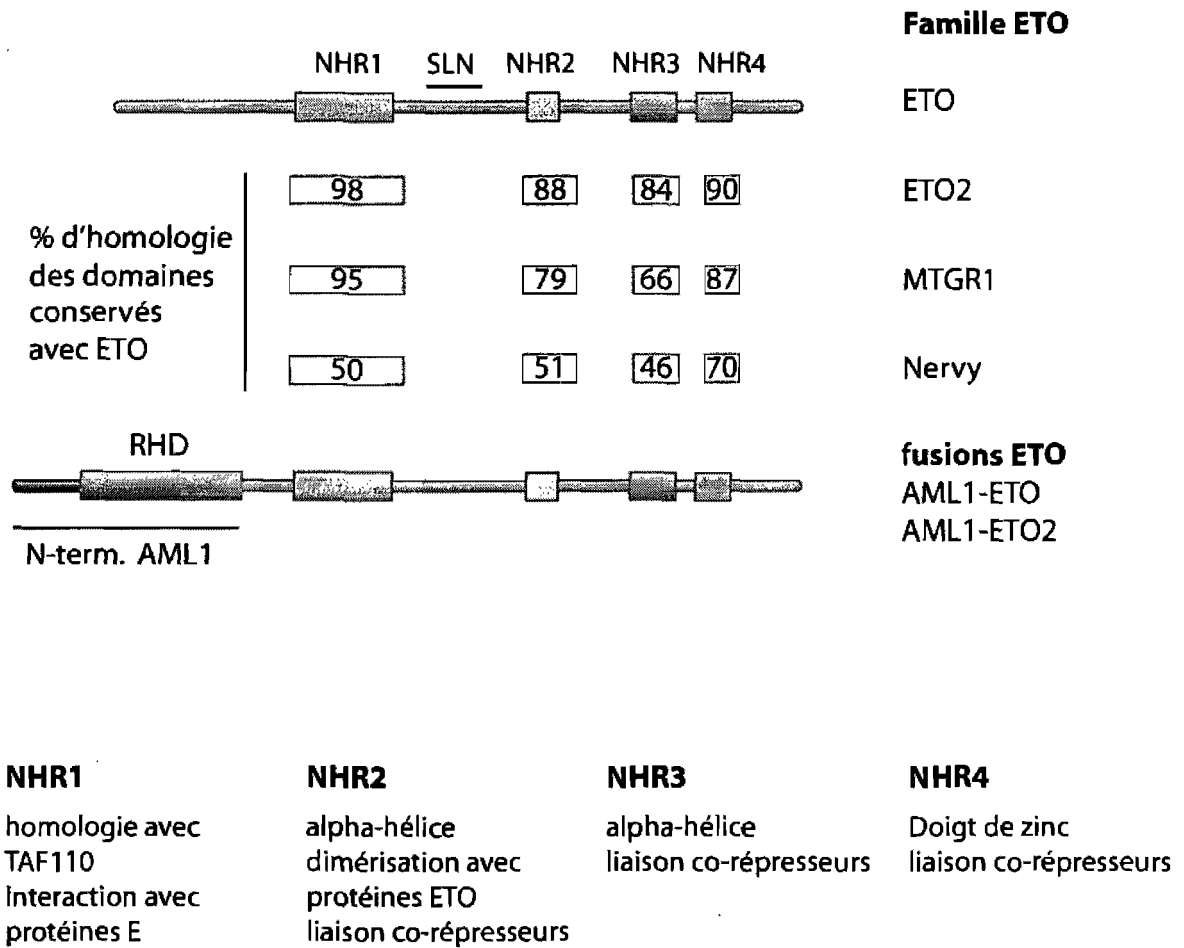


Figure 1-12. Structure protéique de la famille ETO et de la fusion AML1-ETO.

Représentation schématique des domaines conservés (NHR1-4) des membres de la famille ETO, ainsi que le pourcentage d'homologie des différents membres avec la protéine ETO. La fusion avec AML1 implique seulement son domaine de liaison à l'ADN (RHD) et pratiquement toute la protéine ETO ou ETO2. RHD : *Runt Homology Domain*. SLN : signal de localisation nucléaire. Figure adaptée de (Davis et al., 2003) et (Rossetti et al., 2004).

Tout comme le domaine NHR2, le domaine NHR3 présente une structure protéique en hélice. Ce domaine est impliqué dans la liaison des co-répresseurs HDACs, NCoR et Sin3A (Lutterbach et al., 1998b; Hildebrand et al., 2001). Quant au domaine NHR4, il est composé de deux doigts de zinc atypiques (-C-x-x-C-7x-C-x-x-C- et -C-x-x-x-C-7x-H-x-x-x-C-) impliqués dans le recrutement des co-répresseurs NCoR, SMRT et HDACs (Lutterbach et al., 1998b; Gelmetti et al., 1998; Wang et al., 1998). La structure en doigt de Zinc du domaine NHR4 lui suppose une capacité d'interagir avec l'ADN. Toutefois, les protéines ETO sont incapables de lier l'ADN et doivent donc être recrutées par des facteurs de transcription afin d'influencer l'état de la chromatine (Licht, 2001; Kozu et al., 1997).

En ce qui a trait au pouvoir leucémogénique de la fusion AML1-ETO, les domaines NHR3 et NHR4 seraient responsables de ralentir la progression de la maladie. Normalement, les modèles murins de AML1-ETO n'arrivent pas à produire de leucémies (Rhoades et al., 2000; Yuan et al., 2001; Higuchi et al., 2002). Par contre, la délétion simultanée des domaines NHR3 et NHR4 de la fusion AML1-ETO provoque l'apparition précoce de leucémies (Yan et al., 2004), suggérant que ces deux domaines participent à des événements protégeant contre l'apparition de leucémie. D'ailleurs, cette protéine de fusion tronquée est aussi retrouvée naturellement dans des cas de leucémies humaines (Yan et al., 2006). Il est possible que les enzymes de modification de la chromatine liés aux domaines NHR3-NHR4 imposent une répression transcriptionnelle salvatrice à la cellule. Yan *et al.* ont observé que les cellules avec la fusion AML1-ETO tronquée (AML1-ETOtr), sans les domaines NHR3-NHR4, continuaient à proliférer, contrairement à l'arrêt normalement causé par la fusion pleine longueur (Burel et al., 2001; Yan et al., 2004). La perte de ce point de contrôle permettant de réparer les dommages ou d'entrer en apoptose accélérerait ainsi le développement de leucémies.

La séquence de localisation nucléaire (SLN) retrouvée entre les domaines NHR1 et NHR2 constitue une région conservée de la famille NERVY/ETO, essentielle et suffisante pour leur localisation nucléaire (Odaka et al., 2000). Les protéines ETO sont associées à la matrice nucléaire (Le et al., 1998; McNeil et al., 1999), regroupées en foci avec des

protéines impliquées dans la répression transcriptionnelle, telles que GFI-1 (Wood et al., 2000; McGhee et al., 2003). Paradoxalement, les protéines ETOs et NERVY ont aussi été observées dans le cytoplasme (Sacchi et al., 1998; Schillace et al., 2002; Asirvatham et al., 2004; Terman and Kolodkin, 2004). Toutefois, plusieurs chercheurs remettent en question la spécificité des anticorps utilisés (Ice et al., 2005). Par des immuno-localisations et des buvardages de Western, Ice *et al.* démontrent que les anticorps utilisés reconnaissent des protéines ne correspondant pas aux poids moléculaires des protéines ETOs, en plus de détecter la protéine NERVY dans des drosophiles mutantes ne l'exprimant plus. Les protéines ETOs et NERVY seraient donc exclusivement nucléaires.

Sommairement, les trois co-répresseurs ETO affectent la transcription par le recrutement d'enzymes de modification de la chromatine, dont NCoR, Sin3A et les HDACs (Wang et al., 1998; Lutterbach et al., 1998b; Amann et al., 2001; Amann et al., 2005). Ces interactions avec les enzymes de modification de la chromatine se font de façon préférentielle. Tandis qu'ETO interagit avec les HDAC1 à HDAC3, MTGR1 interagit seulement avec HDAC3 et ETO2 avec les HDAC1 à HDAC3, ainsi que les HDAC6 et HDAC8 (Amann et al., 2001; Amann et al., 2005). De plus, ETO2 n'interagit pas avec Sin3A, comme le font ETO ou MTGR1 (Amann et al., 2001; Amann et al., 2005). Ces différences suggèrent que les protéines ETOs ont des fonctions similaires, mais non redondantes. En ce qui a trait à la protéine NERVY, ses interactions avec les co-répresseurs n'ont pas encore été caractérisées, mais j'anticipe que, dans un futur proche, des analyses génétiques chez la drosophile révéleront ces interactions.

### **1.4.3 La famille ETO et les facteurs de transcription**

Étant donné que les protéines ETO ne lient pas directement l'ADN, elles doivent s'associer aux facteurs de transcription capables de les mobiliser sur les régions régulatrices de la chromatine. La littérature actuelle rapporte quelques facteurs de transcription qui permettraient aux protéines ETO d'exercer leurs fonctions transcriptionnelles. Notamment, ETO interagit avec les facteurs de transcription PLZF (Melnick et al., 2000), Gfi-1/Gfi-1b

(McGhee et al., 2003), BCL6 (Chevallier et al., 2004), et HEB (Zhang et al., 2004); tandis qu'ETO2 interagit avec GFI-1/GFI-1b (McGhee et al., 2003), ZFN652 (Kumar et al., 2006) et HEB (Zhang et al., 2004) (voir Figure 1-13). Le recrutement des protéines ETOs permet de réprimer la transcription des gènes régulés par ces facteurs de transcription. L'interaction d'ETO ou ETO2 avec HEB/E2A via le domaine AD1 (Zhang et al., 2004) pourrait expliquer la fonction répressive associée à ce domaine (Markus et al., 2002). Il est aussi intéressant de noter que, pour un même partenaire, les protéines ETO ne possèdent pas toutes le même pouvoir d'interaction, comme ce qui avait été observé avec les modificateurs de la chromatine. Par exemple, ETO interagit plus fortement qu'ETO2 avec GFI-1 (McGhee et al., 2003), suggérant que la combinatoire des partenaires représente un autre niveau de régulation de l'expression génétique.



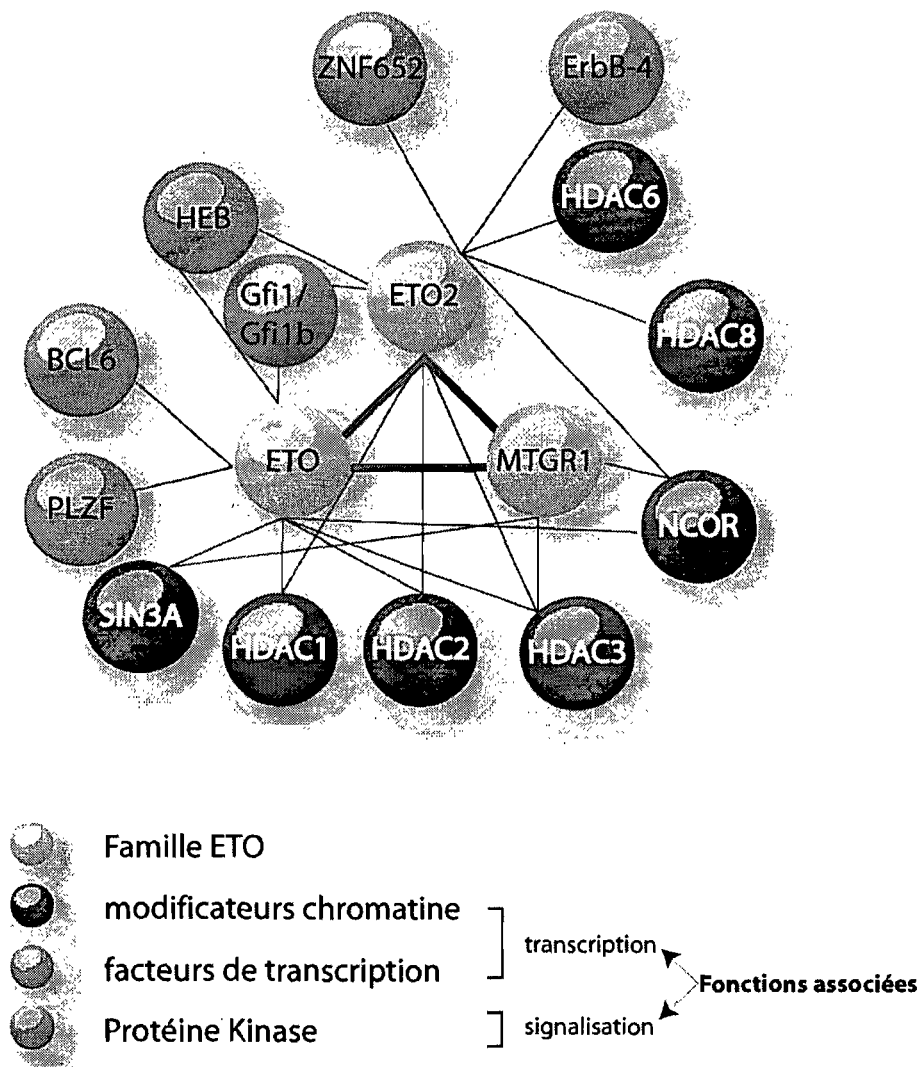


Figure 1-13. Réseau d'interaction protéique de la famille ETO.

Schéma représentant les différentes interactions des membres de la famille ETO et leurs partenaires protéiques rapportées dans la littérature. Les protéines sont catégorisées selon leur fonction. L'interaction des protéines ETO avec ces partenaires leur confère ainsi une fonction associée. Par exemple, la liaison d'ETO avec un modificateur de la chromatine lui attribue un rôle transcriptionnel, tandis que son interaction avec ErbB-4 lui confère un rôle dans la signalisation intracellulaire. Ces interactions ont toutes été démontrées expérimentalement.

## 1.4.4 Les protéines ETO et le cancer

### 1.4.4.1 ETO et la leucémie

Les translocations impliquant ETO ou ETO2 avec AML1 résultent invariablement à leur fusion dans le bon cadre de lecture (*in frame*) de la région N-terminale d'AML1, capable de lier l'ADN, et pratiquement toute la protéine ETO, contenant les quatre domaines conservés (voir Figure 1-12). Étant donné que cette translocation implique AML1, un régulateur central de l'hématopoïèse (Lund and van Lohuizen, 2002), l'attention scientifique a été déviée vers la dérégulation des gènes-cibles de AML1, plutôt que sur l'expression aberrante en soi des protéines ETOs, sous le contrôle du promoteur de AML1. La protéine AML1 fonctionne normalement comme un activateur transcriptionnel, stimulant la différenciation granulocytaire par l'activation de gènes-cibles comme la myeloperoxydase. Selon le modèle classique, la fusion avec ETO transforme l'activateur AML1 en répresseur. Ainsi, les gènes-cibles d'AML1 seraient réprimés par la fusion AML1-ETO. Plusieurs observations supportent ce modèle classique. D'abord, l'haplo-insuffisance d'AML1 engendre l'expansion des progéniteurs immatures, tant dans les modèles murins qu'humains (Song et al., 1999; Sun and Downing, 2004), reproduisant les effets d'AML1-ETO sur les progéniteurs. De plus, AML1 lie le co-activateur p300/CBP, tandis qu'ETO est une plate-forme de recrutement des co-répresseurs, suggérant qu'ETO vient annuler le recrutement des co-activateurs. Ensuite, la fusion AML1-ETO réprime la transcription de gènes suppresseurs de tumeur comme *p14ARF*, normalement activé par AML1 (Linggi et al., 2002). Finalement, le traitement des cellules AML1-ETO avec des inhibiteurs de HDAC empêche la répression exercée par AML1-ETO sur la différenciation et la transcription (Wang et al., 1999). Mises ensembles, ces évidences supportent le modèle classique de la répression génique des gènes cibles d'AML1 comme principal moteur leucémogénique.

Par ailleurs, de nouvelles évidences s'accumulent et remettent en question le modèle classique. Des analyses de profil d'expression globale ont permis de démontrer deux

aspects très importants de la protéine de fusion : 1) AML1-ETO active plus de gènes qu'elle n'en réprime et 2) la majorité des gènes régulés ne possède pas de sites de liaison pour AML1 (Shimada et al., 2000; Dunne et al., 2006; Alcalay et al., 2003). Contrairement à l'idée reçue qu'AML1-ETO n'affectait que des gènes de différenciation, plusieurs des gènes activés par la fusion ont des fonctions associées à l'auto-renouvellement des cellules souches, comme Jagged1, un des ligands du récepteur Notch (Alcalay et al., 2003) et la voie de signalisation Wnt (Muller-Tidow et al., 2004). Ces observations suggèrent qu'AML1-ETO promeut l'expansion des cellules immatures par l'activation et non la répression de gènes-cibles. D'ailleurs, la délétion des domaines NHR3 et NHR4, deux sites d'ancrages des HDAC et co-répresseurs nucléaires (SMRT, Sin3A, NCoR), induit rapidement des leucémies (Yan et al., 2004). De plus, le traitement avec des inhibiteurs de HDAC influence la différenciation, mais non le pouvoir leucémogénique (Grisolano et al., 2003). La perte de la fonction répressive, soit par la délétion des domaines NHR3-NHR4 ou l'utilisation d'inhibiteurs des HDACs, corrèle donc avec l'augmentation du pouvoir leucémogénique, suggérant que la protéine de fusion n'agit pas simplement en convertissant AML1 en répresseur. Étant donné que les gènes cibles de AML1-ETO ne sont principalement pas des gènes normalement régulés par AML1, la fusion est probablement recrutée sur la chromatine par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription, tels que HEB/E2A (Zhang et al., 2004) ou GFI-1 (McGhee et al., 2003).

#### **1.4.4.2 Signalisation et AML1-ETO**

Les évidences cliniques et expérimentales ont mis en valeur l'importance des événements secondaires pour le développement des leucémies AML1-ETO (Rhoades et al., 2000; Yuan et al., 2001; Higuchi et al., 2002). Les modèles de souris transgéniques AML1-ETO ne développent pas de leucémies spontanément. Elles doivent, par exemple, co-exprimer la fusion TEL-PDGFR $\beta$  qui possède une activité kinase constitutive (Grisolano et al., 2003). En clinique, environ 50% des patients leucémiques aux prises avec la fusion AML1-ETO ont aussi des mutations dans le récepteur tyrosine kinase *c-kit*, entraînant son expression constitutive (Wang et al., 2005). D'autres cas présentent des mutations ou des

surexpressions de la kinase FLT-3 ou de la GTPase RAS (Schessl et al., 2005). Ces cas d'AML co-exprimant AML1-ETO et une kinase constitutive répondent généralement bien aux traitements par les inhibiteurs des kinases (Imatinib, Dasatinib et Nilotib) (Wang et al., 2005; Shah et al., 2006; Von Bubnoff et al., 2005). Ces évidences cliniques et expérimentales démontrent la synergie de la signalisation des récepteurs kinases et de la fusion AML1-ETO. De plus, ces observations appuient le modèle classique de leucémogénèse stipulant qu'au moins deux événements collaborateurs doivent se produire : un impliquant la régulation transcriptionnelle et la différenciation hématopoïétique, et l'autre affectant une voie de signalisation impliqué dans la prolifération cellulaire (Gilliland, 2002).

En guise de résumé, la fusion AML1-ETO agirait sur deux plans : inhiber les gènes-cibles de différenciation normalement activés par AML1 et augmenter l'expression de gènes associés à l'auto-renouvellement. En fermant la valve de la différenciation, tout en stimulant la prolifération des cellules immatures, AML1-ETO procure une situation favorable à l'accumulation de dommage à l'ADN et l'activation des voies de signalisation. Ce scénario chaotique conduirait la cellule vers un état néoplasique.

#### **1.4.4.3 ETO2 et le cancer du sein**

Outre son rôle dans la leucémie, ETO2 serait aussi impliquée dans une autre forme de néoplasie, le cancer du sein. Le gène *Eto2* est localisé sur la bande chromosomique 16q24.3, la région de perte d'hétérozygotie (LOH) la plus fréquemment rencontrée dans les cancers du sein, faisant d'ETO2 un suppresseur de tumeur potentiel (Callen et al., 2002; Cleton-Jansen et al., 2001; Powell et al., 2002). Des analyses moléculaires ont par la suite permis de confirmer qu'ETO2 possédait des caractéristiques propres aux suppresseurs de tumeur: son expression est significativement diminuée dans les tumeurs mammaires primaires et dans les lignées cellulaires tumorales MDA-MB-468 et MDA-MB-231 (Kochetkova et al., 2002; Bais et al., 2004). De plus, son expression ectopique dans des lignées de cancer du sein diminue le potentiel néoplasique de ces lignées (Kochetkova et al., 2002). Le mécanisme anti-tumoral pourrait potentiellement être régulé par sa liaison

avec le facteur ZNF656, une protéine de type doigt de zinc dont la fonction est encore inconnue, mais qui présente des propriétés de facteurs de transcription et un patron d'expression similaire à celui d'ETO2 dans les lignées mammaires (Kumar et al., 2006). ETO2 interagit aussi avec le récepteur tyrosine kinase ErbB-4 (Linggi and Carpenter, 2006), impliqué dans la différenciation et la carcinogénèse mammaire (Carpenter, 2003). La liaison du récepteur ErbB-4 et de son ligand, la neureguline, provoque la translocation de sa sous-unité S80 au noyau, où elle peut interagir avec ETO2. L'expression d'ErbB-4 dans les cellules mammaires empêche la fonction répressive transcriptionnelle d'ETO2, sans toutefois requérir la fonction kinase d'ErbB-4, suggérant que la régulation d'ETO2 par ErbB-4 n'implique pas de cascade de signaux de phosphorylation (Linggi and Carpenter, 2006). Il est possible que l'interaction avec ErbB-4 empêche l'interaction d'ETO2 avec des HDACs ou d'autres co-répresseurs. ErbB-4 et ETO2 seraient donc tous deux impliqués dans une même voie moléculaire possiblement impliquée dans la différenciation des cellules mammaires. Bien qu'incomplètes et obtenues uniquement dans des lignées cellulaires, ces données appuient le rôle d'ETO2 dans la carcinogénèse mammaire. Ce rôle anti-tumoral est toutefois contre-intuitif considérant la contribution d'ETO2 dans les leucémies AML. Néanmoins, chaque cellule présente un ensemble de facteurs uniques et la perte (LOH des cancers du sein) ou l'expression aberrante (translocation AML1-ETO2) d'ETO2 peut conduire à des néoplasies dans des contextes distincts, potentiellement par des interactions protéiques différentielles.

### **1.4.5 Rôles physiologiques connus des protéines ETO**

#### **1.4.5.1 Système gastro-intestinal**

La découverte des protéines ETO dans le cadre de translocations leucémiques a précipité les recherches scientifiques vers l'étude de leur rôle dans la leucémogénèse, plutôt que vers leurs fonctions physiologiques. Ce n'est que depuis quelques années que leurs fonctions normales nous sont révélées. L'ablation génétique d'ETO dans un modèle murin démontre son rôle essentiel pour le développement du système gastro-intestinal (Calabi et

al., 2001). Les mutants homozygotes possèdent une viabilité réduite causée par des défauts de la tubulure gastro-intestinale. De plus, la progéniture de ces mutants présente une absence presque complète de l'intestin, allant du duodénum distal jusqu'au colon. Toutefois, les composants cellulaires sont retrouvés dans les bonnes proportions, suggérant que ETO n'affecte pas la différenciation d'un type cellulaire particulier. ETO joue sûrement un rôle vital dans le développement du système gastro-intestinal, mais sa fonction précise et les mécanismes sous-jacents devront être élucidés. Il est intéressant de noter que les souris déficientes pour MTGR1 présentent aussi des défauts au niveau du système gastro-intestinal (Aman et al., 2005). MTGR1 semble requis pour le maintien et la maturation des cellules sécrétoires du petit intestin. À l'instar d'ETO, les mécanismes sous-jacents sont encore obscurs. Assurément, les protéines ETO jouent un rôle crucial dans le développement du système gastro-intestinal.

#### **1.4.5.2 Adipogénèse**

Des analyses fonctionnelles ainsi que le patron d'expression de ETO dans des lignées adipocytaires ont permis d'attribuer à ETO un rôle dans l'adipogénèse. En effet, ETO est fortement exprimée dans les cellules pré-adipocytaires, puis décroît en fonction du degré de différenciation. De plus, sa surexpression dans des lignées cellulaires inhibe la transcription de *C/EBP-β*, un important régulateur de l'adipogénèse (Rosen and Spiegelman, 2000; Rochford et al., 2004). Les fonctions des protéines ETO ne se limiteraient donc pas au système gastro-intestinal, mais aussi à d'autres systèmes.

#### **1.4.5.3 Hématopoïèse**

Au-delà de leur implication dans les leucémies, d'autres évidences supportent un rôle pour les protéines ETO dans l'hématopoïèse normale. D'abord le patron d'expression d'ETO et ETO2 au sein du système hématopoïétique leur suggère un rôle dans la différenciation cellulaire (voir Figure 1-11). La protéine ETO est exprimée très faiblement dans les progéniteurs humains CD34+, puis augmentée dans les érythroblastes (Lindberg et al., 2005). ETO2 présente plutôt la tendance inverse ; elle est fortement exprimée dans les

progéniteurs CD34+, puis diminue au cours de la différenciation granulocytaire et érythrocytaire (Lindberg et al., 2005). Il est plus difficile de se prononcer pour MTGR1, puisqu'il est exprimé dans toutes les populations et que son niveau fluctue plus ou moins entre les différentes populations. MTGR1 n'est probablement pas un déterminant de la différenciation, contrairement à ETO2 ou ETO. L'interaction des membres ETOs avec des facteurs de transcription hémato-spécifiques (HEB, PLZF, BCL6, et GFI-1) leur suggère aussi un rôle dans l'hématopoïèse physiologique. Des trois membres, ETO2 se distingue comme régulateur potentiel de la différenciation hématopoïétique et du maintien des cellules souches. En plus de son expression enrichie dans les cellules souches et les progéniteurs, sa perte de fonction chez *Xenopus* empêche l'apparition des premières cellules sanguines définitives (Meier et al., 2006). Des études fonctionnelles chez la souris permettront de confirmer les fonctions hématopoïétiques d'ETO2 chez les organismes mammaliens.

#### **1.4.5.4 Le rôle de la protéine NERVY dans le développement neuronal et mécanosensoriel.**

La protéine NERVY, homologue ETO chez la drosophile, est essentielle pour le développement du système neuronal de la drosophile, plus spécifiquement pour la répulsion des axones en formation (Terman and Kolodkin, 2004). Terman et Kolodkin attribuent ces effets à la localisation cytoplasmique de NERVY et son rôle dans la signalisation intracellulaire en tant que protéines d'ancrage des PKA (AKAP). Les AKAP déterminent leur distribution spatio-temporelle et permettent la phosphorylation de protéines-cibles en réponse à l'augmentation locale de cAMP (Felicciello et al., 2001). Toutefois, bien que l'effet sur le développement des neurones soit certain, Ice et ses collègues ont remis en doute la spécificité des anticorps utilisés (Ice et al., 2005), tel qu'expliqué dans la section 1.4.2. Ils proposent plutôt que cet effet serait dû à l'interaction de NERVY avec des facteurs de transcription et des co-répresseurs, tout comme les protéines ETOs mammaliennes.

D'ailleurs, le groupe de Mann a récemment démontré l'interaction de NERVY avec le HLH *Daughterless* (Da), l'homologue des protéines E (Wildonger and Mann, 2005). La protéine Da interagit avec les facteurs de transcription bHLH *achaete* (ac) et *scute* (sc), des HLH essentiels dirigeant la formation de l'organe précurseur sensoriel (SOP). Le SOP exprime des niveaux élevés de *ac* et *sc* et envoie des signaux de types Notch aux cellules avoisinantes afin de les empêcher d'adopter un destin neuronal. Les auteurs démontrent que NERVY est aussi exprimé dans la SOP où elle interagit avec *Da*, influençant ainsi l'expression des gènes-cibles de *ac* et *sc*. Des études de perte et de gain de fonction prouvent que, sans être essentielle, NERVY stimule le développement des SOP en amplifiant les signaux Notch. NERVY, à l'instar de ces homologues mammaliens, agirait aussi au niveau du noyau en interagissant avec des facteurs de transcription, modifiant ou renforçant le destin cellulaire.

#### **1.4.6 La polyvalence de la famille ETO**

En somme, les protéines ETOs, d'abord identifiées dans un contexte leucémique, sont aussi d'importants régulateurs de plusieurs systèmes physiologiques. En agissant à titre de plateforme de recrutement, elles permettent une relation intime entre les facteurs de transcription et les enzymes de modification de la chromatine, procurant ainsi une régulation précise de l'expression génique. Les analyses de perte et de gain de fonction de ces protéines en sont encore à leur début, mais déjà des rôles physiologiques leur sont attribués. La caractérisation d'autres partenaires d'ETO nous révélera sûrement d'autres fonctions de cette famille émergente et nous fournira des explications quant aux mécanismes leucémogéniques d'AML1-ETO.



## 1.5 Objectifs

La protéine SCL régule plusieurs aspects du système hématopoïétique. Cette diversité d'action est possible grâce aux propriétés modulaires de SCL, lui permettant d'interagir avec plusieurs partenaires ubiquitaires ou spécifiques. Ces complexes SCL hautement dynamiques permettent d'allumer ou d'éteindre les programmes génétiques du système hématopoïétique et d'engendrer ainsi la grande diversité cellulaire de ce système. Tel qu'exposé précédemment, quelques complexes ont été isolés ou déduits, mais plusieurs variantes restent à découvrir. Au moment de débiter ma thèse, aucune analyse protéomique exhaustive du complexe n'avait été faite, expliquant pourquoi si peu de partenaires avaient à ce jour été identifiés. La découverte de ces nouveaux partenaires permettra l'identification de nouveaux mécanismes de régulation concernant, évidemment, le complexe SCL, mais aussi la régulation transcriptionnelle de l'hématopoïèse en général.

Le but premier de cette thèse exploratoire était donc de réaliser une analyse systématique des complexes SCL, afin d'avoir une représentation plus juste de la régulation transcriptionnelle hématopoïétique. Grâce à une approche de purification de complexes SCL physiologiques, couplée à une analyse en spectrométrie de masse, j'ai pu identifier de nouveaux partenaires de SCL, dont ETO2, révélateur de nouveaux mécanismes de régulation. Je présente d'abord la caractérisation fonctionnelle d'ETO2 dans les érythrocytes (Chapitre 2), puis au niveau des cellules souches hématopoïétiques (Chapitre 3). Finalement, les autres partenaires que j'ai identifiés sont présentés à l'annexe I et analysés dans la discussion générale.

## 1.6 Références

- Agulnick,A.D., Taira,M., Breen,J.J., Tanaka,T., Dawid,I.B., and Westphal,H. (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature* 384, 270-272.
- Akala,O.O. and Clarke,M.F. (2006). Hematopoietic stem cell self-renewal. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 496-501.
- Alcalay,M., Meani,N., Gelmetti,V., Fantozzi,A., Fagioli,M., Orleth,A., Riganelli,D., Sebastiani,C., Cappelli,E., Casciari,C., Sciurpi,M.T., Mariano,A.R., Minardi,S.P., Luzi,L., Muller,H., Di Fiore,P.P., Frosina,G., and Pelicci,P.G. (2003). Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J. Clin. Invest* 112, 1751-1761.
- Amann,J.M., Nip,J., Strom,D.K., Lutterbach,B., Harada,H., Lenny,N., Downing,J.R., Meyers,S., and Hiebert,S.W. (2001). ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. *Mol. Cell Biol.* 21, 6470-6483.
- Amann,J.M., Chyla,B.J., Ellis,T.C., Martinez,A., Moore,A.C., Franklin,J.L., McGhee,L., Meyers,S., Ohm,J.E., Luce,K.S., Ouelette,A.J., Washington,M.K., Thompson,M.A., King,D., Gautam,S., Coffey,R.J., Whitehead,R.H., and Hiebert,S.W. (2005). Mtgr1 is a transcriptional corepressor that is required for maintenance of the secretory cell lineage in the small intestine. *Mol. Cell Biol.* 25, 9576-9585.
- Anguita,E., Hughes,J., Heyworth,C., Blobel,G.A., Wood,W.G., and Higgs,D.R. (2004). Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *EMBO J.* 23, 2841-2852.
- Aplan,P.D., Nakahara,K., Orkin,S.H., and Kirsch,I.R. (1992). The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *EMBO J.* 11, 4073-4081.
- Aplan,P.D., Jones,C.A., Chervinsky,D.S., Zhao,X., Ellsworth,M., Wu,C., McGuire,E.A., and Gross,K.W. (1997). An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J.* 16, 2408-2419.
- Asirvatham,A.L., Galligan,S.G., Schillace,R.V., Davey,M.P., Vasta,V., Beavo,J.A., and Carr,D.W. (2004). A-kinase anchoring proteins interact with phosphodiesterases in T lymphocyte cell lines. *J. Immunol.* 173, 4806-4814.
- Bain,G., Engel,I., Robanus Maandag,E.C., te Riele,H.P., Volland,J.R., Sharp,L.L., Chun,J., Huey,B., Pinkel,D., and Murre,C. (1997). E2A deficiency leads to abnormalities in

- alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol. Cell Biol.* *17*, 4782-4791.
- Bain, G. and Murre, C. (1998). The role of E-proteins in B- and T-lymphocyte development. *Semin. Immunol.* *10*, 143-153.
- Bais, A.J., Gardner, A.E., McKenzie, O.L., Callen, D.F., Sutherland, G.R., and Kremmidiotis, G. (2004). Aberrant CBFA2T3B gene promoter methylation in breast tumors. *Mol. Cancer* *3*, 22.
- Baker, S.P. and Grant, P.A. (2007). The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene* *26*, 5329-5340.
- Barndt, R., Dai, M.F., and Zhuang, Y. (1999). A novel role for HEB downstream or parallel to the pre-TCR signaling pathway during alpha beta thymopoiesis. *J. Immunol.* *163*, 3331-3343.
- Baron, M. (2001). Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehog-mediated signals. *Differentiation* *68*, 175-185.
- Bash, R.O., Hall, S., Timmons, C.F., Crist, W.M., Amylon, M., Smith, R.G., and Baer, R. (1995). Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study. *Blood* *86*, 666-676.
- Begley, C.G. and Green, A.R. (1999). The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood* *93*, 2760-2770.
- Bender, M.A., Bulger, M., Close, J., and Groudine, M. (2000). Beta-globin gene switching and DNase I sensitivity of the endogenous beta-globin locus in mice do not require the locus control region. *Mol. Cell* *5*, 387-393.
- Bertrand, J.Y., Giroux, S., Golub, R., Klaine, M., Jalil, A., Boucontet, L., Godin, I., and Cumano, A. (2005). Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 134-139.
- Blom, B., Heemskerk, M.H., Verschuren, M.C., van Dongen, J.J., Stegmann, A.P., Bakker, A.Q., Couwenberg, F., Res, P.C., and Spits, H. (1999). Disruption of alpha beta but not of gamma delta T cell development by overexpression of the helix-loop-helix protein Id3 in committed T cell progenitors. *EMBO J.* *18*, 2793-2802.
- Brady, G., Billia, F., Knox, J., Hoang, T., Kirsch, I.R., Voura, E.B., Hawley, R.G., Cumming, R., Buchwald, M., and Siminovitch, K. (1995). Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells. *Curr. Biol.* *5*, 909-922.

- Brunet de la, G.P., Armstrong, F., Duval, V., Rouyez, M.C., Goardon, N., Romeo, P.H., and Pflumio, F. (2006). Low SCL/TAL1 expression reveals its major role in adult hematopoietic myeloid progenitors and stem cells. *Blood* 108, 2998-3004.
- Burel, S.A., Harakawa, N., Zhou, L., Pabst, T., Tenen, D.G., and Zhang, D.E. (2001). Dichotomy of AML1-ETO functions: growth arrest versus block of differentiation. *Mol. Cell Biol.* 21, 5577-5590.
- Calabi, F. and Cilli, V. (1998). CBFA2T1, a gene rearranged in human leukemia, is a member of a multigene family. *Genomics* 52, 332-341.
- Calabi, F., Pannell, R., and Pavloska, G. (2001). Gene targeting reveals a crucial role for MTG8 in the gut. *Mol. Cell Biol.* 21, 5658-5666.
- Calkhoven, C.F., Muller, C., Martin, R., Kros, G., Pietsch, H., Hoang, T., and Leutz, A. (2003). Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice. *Genes Dev.* 17, 959-964.
- Callen, D.F., Crawford, J., Derwas, C., Cleton-Jansen, A.M., Cornelisse, C.J., and Baker, E. (2002). Defining regions of loss of heterozygosity of 16q in breast cancer cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet.* 133, 76-82.
- Carey, M. (1998). The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* 92, 5-8.
- Carpenter, G. (2003). ErbB-4: mechanism of action and biology. *Exp. Cell Res.* 284, 66-77.
- Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P., and Bernstein, A. (1988). The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335, 88-89.
- Chasis, J.A. and Mohandas, N. (1992). Red blood cell glycoporphins. *Blood* 80, 1869-1879.
- Chervinsky, D.S., Zhao, X.F., Lam, D.H., Ellsworth, M., Gross, K.W., and Aplan, P.D. (1999). Disordered T-cell development and T-cell malignancies in SCL LMO1 double-transgenic mice: parallels with E2A-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* 19, 5025-5035.
- Chevallier, N., Corcoran, C.M., Lennon, C., Hyjek, E., Chadburn, A., Bardwell, V.J., Licht, J.D., and Melnick, A. (2004). ETO protein of t(8;21) AML is a corepressor for Bcl-6 B-cell lymphoma oncoprotein. *Blood* 103, 1454-1463.
- Chishti, A.H., Palek, J., Fisher, D., Maalouf, G.J., and Liu, S.C. (1996). Reduced invasion and growth of *Plasmodium falciparum* into elliptocytic red blood cells with a combined deficiency of protein 4.1, glycoporphin C, and p55. *Blood* 87, 3462-3469.

- Choo,K.H. (2001). Domain organization at the centromere and neocentromere. *Dev. Cell* 1, 165-177.
- Cleton-Jansen,A.M., Callen,D.F., Seshadri,R., Goldup,S., McCallum,B., Crawford,J., Powell,J.A., Settasatian,C., van,B.H., Moerland,E.W., Smit,V.T., Harris,W.H., Millis,R., Morgan,N.V., Barnes,D., Mathew,C.G., and Cornelisse,C.J. (2001). Loss of heterozygosity mapping at chromosome arm 16q in 712 breast tumors reveals factors that influence delineation of candidate regions. *Cancer Res.* 61, 1171-1177.
- Coghill,E., Eccleston,S., Fox,V., Cerruti,L., Brown,C., Cunningham,J., Jane,S., and Perkins,A. (2001). Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) coordinates erythroid cell proliferation and hemoglobinization in cell lines derived from EKLF null mice. *Blood* 97, 1861-1868.
- Condorelli,G.L., Facchiano,F., Valtieri,M., Proietti,E., Vitelli,L., Lulli,V., Huebner,K., Peschle,C., and Croce,C.M. (1996). T-cell-directed TAL-1 expression induces T-cell malignancies in transgenic mice. *Cancer Res.* 56, 5113-5119.
- Cumano,A., eterlen-Lievre,F., and Godin,I. (1996). Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86, 907-916.
- Curtis,D.J., Hall,M.A., Van Stekelenburg,L.J., Robb,L., Jane,S.M., and Begley,C.G. (2004). SCL is required for normal function of short-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* 103, 3342-3348.
- Davis,J.N., Williams,B.J., Herron,J.T., Galiano,F.J., and Meyers,S. (1999). ETO-2, a new member of the ETO-family of nuclear proteins. *Oncogene* 18, 1375-1383.
- Davis,J.N., McGhee,L., and Meyers,S. (2003). The ETO (MTG8) gene family. *Gene* 303, 1-10.
- Deleuze,V., Chalhoub,E., El-Hajj,R., Dohet,C., Le,C.M., Couraud,P.O., Huber,P., and Mathieu,D. (2007). TAL-1/SCL and its partners E47 and LMO2 up-regulate VE-cadherin expression in endothelial cells. *Mol. Cell Biol.* 27, 2687-2697.
- Desrosiers,M., Lecuyer,E., Herblot,S., Tremblay,M., Lambert,J.A., Thibault,P., and Hoang,T. (2008). Deciphering a novel role of E2A and HEB on the hematopoietic transcription factor SCL. in preparation.
- Drake,C.J., Brandt,S.J., Trusk,T.C., and Little,C.D. (1997). TAL1/SCL is expressed in endothelial progenitor cells/angioblasts and defines a dorsal-to-ventral gradient of vasculogenesis. *Dev. Biol.* 192, 17-30.

- Drake, C.J. and Fleming, P.A. (2000). Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood* 95, 1671-1679.
- Dunne, J., Cullmann, C., Ritter, M., Soria, N.M., Drescher, B., Debernardi, S., Skoulakis, S., Hartmann, O., Krause, M., Krauter, J., Neubauer, A., Young, B.D., and Heidenreich, O. (2006). siRNA-mediated AML1/MTG8 depletion affects differentiation and proliferation-associated gene expression in t(8;21)-positive cell lines and primary AML blasts. *Oncogene* 25, 6067-6078.
- Eisbacher, M., Holmes, M.L., Newton, A., Hogg, P.J., Khachigian, L.M., Crossley, M., and Chong, B.H. (2003). Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocyte-specific genes through cooperative DNA binding. *Mol. Cell Biol.* 23, 3427-3441.
- Eissenberg, J.C. and Elgin, S.C. (2000). The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 204-210.
- Elefanty, A.G., Begley, C.G., Hartley, L., Papaevangeliou, B., and Robb, L. (1999). SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood* 94, 3754-3763.
- Elnitski, L., Miller, W., and Hardison, R. (1997). Conserved E boxes function as part of the enhancer in hypersensitive site 2 of the beta-globin locus control region. Role of basic helix-loop-helix proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 369-378.
- Elwood, N.J., Zogos, H., Pereira, D.S., Dick, J.E., and Begley, C.G. (1998). Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34(+) cells: consequence of enforced expression of SCL. *Blood* 91, 3756-3765.
- Feinstein, P.G., Kornfeld, K., Hogness, D.S., and Mann, R.S. (1995). Identification of homeotic target genes in *Drosophila melanogaster* including *nervy*, a proto-oncogene homologue. *Genetics* 140, 573-586.
- Feliciello, A., Gottesman, M.E., and Avvedimento, E.V. (2001). The biological functions of A-kinase anchor proteins. *J. Mol. Biol.* 308, 99-114.
- Fisch, P., Boehm, T., Lavenir, I., Larson, T., Arno, J., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (1992). T-cell acute lymphoblastic lymphoma induced in transgenic mice by the RBTN1 and RBTN2 LIM-domain genes. *Oncogene* 7, 2389-2397.
- Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C.D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 172-183.

- Fleming, W.H., Alpern, E.J., Uchida, N., Ikuta, K., Spangrude, G.J., and Weissman, I.L. (1993). Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *J. Cell Biol.* 122, 897-902.
- Forsberg, E.C. and Bresnick, E.H. (2001). Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world. *Bioessays* 23, 820-830.
- Fracchiolla, N.S., Colombo, G., Finelli, P., Maiolo, A.T., and Neri, A. (1998). EHT, a new member of the MTG8/ETO gene family, maps on 20q11 region and is deleted in acute myeloid leukemias. *Blood* 92, 3481-3484.
- Gamou, T., Kitamura, E., Hosoda, F., Shimizu, K., Shinohara, K., Hayashi, Y., Nagase, T., Yokoyama, Y., and Ohki, M. (1998). The partner gene of AML1 in t(16;21) myeloid malignancies is a novel member of the MTG8(ETO) family. *Blood* 91, 4028-4037.
- Gelmetti, V., Zhang, J., Fanelli, M., Minucci, S., Pelicci, P.G., and Lazar, M.A. (1998). Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. *Mol. Cell Biol.* 18, 7185-7191.
- Genomics Institute of the Novartis Research Foundation. Human GeneAtlas. [www.SymAtlas.gnf.org](http://www.SymAtlas.gnf.org) . 1-26-2008. 1-26-2008.
- George, K.M., Leonard, M.W., Roth, M.E., Lieuw, K.H., Kioussis, D., Grosveld, F., and Engel, J.D. (1994). Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development* 120, 2673-2686.
- Gering, M., Rodaway, A.R., Gottgens, B., Patient, R.K., and Green, A.R. (1998). The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *EMBO J.* 17, 4029-4045.
- Gering, M., Yamada, Y., Rabbitts, T.H., and Patient, R.K. (2003). Lmo2 and Scl/Tal1 convert non-axial mesoderm into haemangioblasts which differentiate into endothelial cells in the absence of Gata1. *Development* 130, 6187-6199.
- Gilliland, D.G. (2002). Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Semin. Hematol.* 39, 6-11.
- Goardon, N., Lambert, J.A., Rodriguez, P., Nissaire, P., Herblot, S., Thibault, P., Dumenil, D., Strouboulis, J., Romeo, P.H., and Hoang, T. (2006). ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J.* 25, 357-366.
- Godin, I. and Cumano, A. (2002). The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 593-604.

- Goldfarb, A.N. and Lewandowska, K. (1995). Inhibition of cellular differentiation by the SCL/tal oncoprotein: transcriptional repression by an Id-like mechanism. *Blood* 85, 465-471.
- Gothot, A., Pyatt, R., McMahon, J., Rice, S., and Srour, E.F. (1997). Functional heterogeneity of human CD34(+) cells isolated in subcompartments of the G0 /G1 phase of the cell cycle. *Blood* 90, 4384-4393.
- Gottgens, B., Barton, L.M., Gilbert, J.G., Bench, A.J., Sanchez, M.J., Bahn, S., Mistry, S., Grafham, D., McMurray, A., Vaudin, M., Amaya, E., Bentley, D.R., Green, A.R., and Sinclair, A.M. (2000). Analysis of vertebrate SCL loci identifies conserved enhancers. *Nat. Biotechnol.* 18, 181-186.
- Gottgens, B., Nastos, A., Kinston, S., Piltz, S., Delabesse, E.C., Stanley, M., Sanchez, M.J., Ciau-Uitz, A., Patient, R., and Green, A.R. (2002). Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *EMBO J.* 21, 3039-3050.
- Grass, J.A., Boyer, M.E., Pal, S., Wu, J., Weiss, M.J., and Bresnick, E.H. (2003). GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8811-8816.
- Green, A.R., Lints, T., Visvader, J., Harvey, R., and Begley, C.G. (1992). SCL is coexpressed with GATA-1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain. *Oncogene* 7, 653-660.
- Grisolano, J.L., O'Neal, J., Cain, J., and Tomasson, M.H. (2003). An activated receptor tyrosine kinase, TEL/PDGFBetaR, cooperates with AML1/ETO to induce acute myeloid leukemia in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 9506-9511.
- Grutz, G.G., Bucher, K., Lavenir, I., Larson, T., Larson, R., and Rabbitts, T.H. (1998). The oncogenic T cell LIM-protein Lmo2 forms part of a DNA-binding complex specifically in immature T cells. *EMBO J.* 17, 4594-4605.
- Guenther, M.G., Barak, O., and Lazar, M.A. (2001). The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol. Cell Biol.* 21, 6091-6101.
- Hall, M.A., Curtis, D.J., Metcalf, D., Elefanty, A.G., Sourris, K., Robb, L., Gothert, J.R., Jane, S.M., and Begley, C.G. (2003). The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 992-997.



- Hansson,A., Manetopoulos,C., Jonsson,J.I., and Axelson,H. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL inhibits the expression of the p16INK4A and pTalpha genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1073-1081.
- Hartwell,L.H., Hopfield,J.J., Leibler,S., and Murray,A.W. (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature* 402, C47-C52.
- Hatzis,P. and Talianidis,I. (2002). Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol. Cell* 10, 1467-1477.
- Herblot,S., Steff,A.M., Hugo,P., Aplan,P.D., and Hoang,T. (2000). SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat. Immunol.* 1, 138-144.
- Higuchi,M., O'Brien,D., Kumaravelu,P., Lenny,N., Yeoh,E.J., and Downing,J.R. (2002). Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 1, 63-74.
- Hildebrand,D., Tiefenbach,J., Heinzl,T., Grez,M., and Maurer,A.B. (2001). Multiple regions of ETO cooperate in transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* 276, 9889-9895.
- Hiratani,I., Yamamoto,N., Mochizuki,T., Ohmori,S.Y., and Taira,M. (2003). Selective degradation of excess Ldb1 by Rnf12/RLIM confers proper Ldb1 expression levels and Xlim-1/Ldb1 stoichiometry in *Xenopus* organizer functions. *Development* 130, 4161-4175.
- Ho,I.C., Vorhees,P., Marin,N., Oakley,B.K., Tsai,S.F., Orkin,S.H., and Leiden,J.M. (1991). Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor alpha gene. *EMBO J.* 10, 1187-1192.
- Hoang,T., Paradis,E., Brady,G., Billia,F., Nakahara,K., Iscove,N.N., and Kirsch,I.R. (1996). Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* 87, 102-111.
- Hoang,T. (2004). The origin of hematopoietic cell type diversity. *Oncogene* 23, 7188-7198.
- Hodgson,G.S., Bradley,T.R., and Radley,J.M. (1982). The organization of hemopoietic tissue as inferred from the effects of 5-fluorouracil. *Exp. Hematol.* 10, 26-35.
- Howard,M.L. and Davidson,E.H. (2004). cis-Regulatory control circuits in development. *Dev. Biol.* 271, 109-118.

- Hsu,H.L., Huang,L., Tsan,J.T., Funk,W., Wright,W.E., Hu,J.S., Kingston,R.E., and Baer,R. (1994a). Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell Biol.* *14*, 1256-1265.
- Hsu,H.L., Wadman,I., Tsan,J.T., and Baer,R. (1994b). Positive and negative transcriptional control by the TAL1 helix-loop-helix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 5947-5951.
- Huang,S., Qiu,Y., Stein,R.W., and Brandt,S.J. (1999). p300 functions as a transcriptional coactivator for the TAL1/SCL oncoprotein. *Oncogene* *18*, 4958-4967.
- Huang,S. and Brandt,S.J. (2000). mSin3A regulates murine erythroleukemia cell differentiation through association with the TAL1 (or SCL) transcription factor. *Mol. Cell Biol.* *20*, 2248-2259.
- Huang,S., Qiu,Y., Shi,Y., Xu,Z., and Brandt,S.J. (2000). P/CAF-mediated acetylation regulates the function of the basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL. *EMBO J.* *19*, 6792-6803.
- Iannolo,G., Conticello,C., Memeo,L., and De Maria,R. (2007). Apoptosis in normal and cancer stem cells. *Crit Rev. Oncol. Hematol.*
- Ice,R.J., Wildonger,J., Mann,R.S., and Hiebert,S.W. (2005). Comment on "Nervy links protein kinase A to plexin-mediated semaphorin repulsion". *Science* *309*, 558.
- Ivanova,N.B., Dimos,J.T., Schaniel,C., Hackney,J.A., Moore,K.A., and Lemischka,I.R. (2002). A stem cell molecular signature. *Science* *298*, 601-604.
- Jenuwein,T. and Allis,C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074-1080.
- Jones,E.A., Crotty,D., Kulesa,P.M., Waters,C.W., Baron,M.H., Fraser,S.E., and Dickinson,M.E. (2002). Dynamic in vivo imaging of postimplantation mammalian embryos using whole embryo culture. *Genesis* *34*, 228-235.
- Jurata,L.W., Kenny,D.A., and Gill,G.N. (1996). Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 11693-11698.
- Kallianpur,A.R., Jordan,J.E., and Brandt,S.J. (1994). The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood* *83*, 1200-1208.
- Kay,H.E. (1965). How many cell-generations? *Lancet* *2*, 418-419.

- Kelliher, M.A., Seldin, D.C., and Leder, P. (1996). Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase II $\alpha$ . *EMBO J.* *15*, 5160-5166.
- Kim, D., Peng, X.C., and Sun, X.H. (1999). Massive apoptosis of thymocytes in T-cell-deficient Id1 transgenic mice. *Mol. Cell Biol.* *19*, 8240-8253.
- Kitabayashi, I., Ida, K., Morohoshi, F., Yokoyama, A., Mitsuhashi, N., Shimizu, K., Nomura, N., Hayashi, Y., and Ohki, M. (1998). The AML1-MTG8 leukemic fusion protein forms a complex with a novel member of the MTG8(ETO/CDR) family, MTGR1. *Mol. Cell Biol.* *18*, 846-858.
- Kochetkova, M., McKenzie, O.L., Bais, A.J., Martin, J.M., Secker, G.A., Seshadri, R., Powell, J.A., Hinze, S.J., Gardner, A.E., Spendlove, H.E., O'Callaghan, N.J., Cleton-Jansen, A.M., Cornelisse, C., Whitmore, S.A., Crawford, J., Kremmidiotis, G., Sutherland, G.R., and Callen, D.F. (2002). CBFA2T3 (MTG16) is a putative breast tumor suppressor gene from the breast cancer loss of heterozygosity region at 16q24.3. *Cancer Res.* *62*, 4599-4604.
- Kozu, T., Komori, A., Sueoka, E., Fujiki, H., Kaneko, Y., Matsui, T., Uehara, T., Seino, Y., and Ishii, M. (1997). Significance of MTG8 in leukemogenesis. *Leukemia* *11 Suppl 3*, 297-298.
- Kumar, R., Manning, J., Spendlove, H.E., Kremmidiotis, G., McKirdy, R., Lee, J., Millband, D.N., Cheney, K.M., Stampfer, M.R., Dwivedi, P.P., Morris, H.A., and Callen, D.F. (2006). ZNF652, a novel zinc finger protein, interacts with the putative breast tumor suppressor CBFA2T3 to repress transcription. *Mol. Cancer Res.* *4*, 655-665.
- Kunisato, A., Chiba, S., Saito, T., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Yamaguchi, T., and Hirai, H. (2004). Stem cell leukemia protein directs hematopoietic stem cell fate. *Blood* *103*, 3336-3341.
- Lacombe, J., Herblot, S., Haman, A., Iscove, N.N., Sauvageau, G., and Hoang, T. (2008). SCL and E2A gene dosage controls long term hematopoietic stem cell self-renewal. in preparation.
- Lahlil, R., Lecuyer, E., Herblot, S., and Hoang, T. (2004). SCL assembles a multifactorial complex that determines glycoprotein A expression. *Mol. Cell Biol.* *24*, 1439-1452.
- Landry, J.R., Kinston, S., Knezevic, K., de Bruijn, M.F., Wilson, N., Nottingham, W.T., Peitz, M., Edenhofer, F., Pimanda, J.E., Ottersbach, K., and Gottgens, B. (2008). Runx genes are direct targets of Scl/Tal1 in the yolk sac and fetal liver. *Blood*.

- Larson,R.C., Fisch,P., Larson,T.A., Lavenir,I., Langford,T., King,G., and Rabbitts,T.H. (1994). T cell tumours of disparate phenotype in mice transgenic for Rbtn-2. *Oncogene* 9, 3675-3681.
- Larson,R.C., Osada,H., Larson,T.A., Lavenir,I., and Rabbitts,T.H. (1995). The oncogenic LIM protein Rbtn2 causes thymic developmental aberrations that precede malignancy in transgenic mice. *Oncogene* 11, 853-862.
- Larson,R.C., Lavenir,I., Larson,T.A., Baer,R., Warren,A.J., Wadman,I., Nottage,K., and Rabbitts,T.H. (1996). Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 15, 1021-1027.
- Le,X.F., Claxton,D., Kornblau,S., Fan,Y.H., Mu,Z.M., and Chang,K.S. (1998). Characterization of the ETO and AML1-ETO proteins involved in 8;21 translocation in acute myelogenous leukemia. *Eur. J. Haematol.* 60, 217-225.
- Lecuyer,E., Herblot,S., Saint-Denis,M., Martin,R., Begley,C.G., Porcher,C., Orkin,S.H., and Hoang,T. (2002). The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* 100, 2430-2440.
- Lecuyer,E. and Hoang,T. (2004). SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp. Hematol.* 32, 11-24.
- Lecuyer,E., Lariviere,S., Sincennes,M.C., Haman,A., Lahlil,R., Todorova,M., Tremblay,M., Wilkes,B.C., and Hoang,T. (2007). Protein Stability and Transcription Factor Complex Assembly Determined by the SCL-LMO2 Interaction. *J. Biol. Chem.* 282, 33649-33658.
- Lee,T.I., Rinaldi,N.J., Robert,F., Odom,D.T., Bar-Joseph,Z., Gerber,G.K., Hannett,N.M., Harbison,C.T., Thompson,C.M., Simon,I., Zeitlinger,J., Jennings,E.G., Murray,H.L., Gordon,D.B., Ren,B., Wyrick,J.J., Tagne,J.B., Volkert,T.L., Fraenkel,E., Gifford,D.K., and Young,R.A. (2002). Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 298, 799-804.
- Leemhuis,T., Yoder,M.C., Grigsby,S., Aguero,B., Eder,P., and Srour,E.F. (1996). Isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33342 and Rhodamine 123. *Exp. Hematol.* 24, 1215-1224.
- Levine,M. and Tjian,R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424, 147-151.
- Li,F., Ackermann,E.J., Bennett,C.F., Rothermel,A.L., Plescia,J., Tognin,S., Villa,A., Marchisio,P.C., and Altieri,D.C. (1999). Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat. Cell Biol.* 1, 461-466.

- Li,J., Wang,J., Wang,J., Nawaz,Z., Liu,J.M., Qin,J., and Wong,J. (2000). Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *EMBO J.* 19, 4342-4350.
- Liao,E.C., Paw,B.H., Oates,A.C., Pratt,S.J., Postlethwait,J.H., and Zon,L.I. (1998). SCL/Tal-1 transcription factor acts downstream of cloche to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes Dev.* 12, 621-626.
- Licht,J.D. (2001). AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene* 20, 5660-5679.
- Lindberg,S.R., Olsson,A., Persson,A.M., and Olsson,I. (2005). The Leukemia-associated ETO homologues are differently expressed during hematopoietic differentiation. *Exp. Hematol.* 33, 189-198.
- Ling,K.W., Ottersbach,K., van Hamburg,J.P., Oziemlak,A., Tsai,F.Y., Orkin,S.H., Ploemacher,R., Hendriks,R.W., and Dzierzak,E. (2004). GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 200, 871-882.
- Lingbeck,J.M., Trausch-Azar,J.S., Ciechanover,A., and Schwartz,A.L. (2005). E12 and E47 modulate cellular localization and proteasome-mediated degradation of MyoD and Id1. *Oncogene* 24, 6376-6384.
- Linggi,B., Muller-Tidow,C., van de,L.L., Hu,M., Nip,J., Serve,H., Berdel,W.E., van der,R.B., Quelle,D.E., Rowley,J.D., Cleveland,J., Jansen,J.H., Pandolfi,P.P., and Hiebert,S.W. (2002). The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* 8, 743-750.
- Linggi,B. and Carpenter,G. (2006). ErbB-4 s80 intracellular domain abrogates ETO2-dependent transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* 281, 25373-25380.
- Liu,Y., Cheney,M.D., Gaudet,J.J., Chruszcz,M., Lukasik,S.M., Sugiyama,D., Lary,J., Cole,J., Dauter,Z., Minor,W., Speck,N.A., and Bushweller,J.H. (2006). The tetramer structure of the Nervy homology two domain, NHR2, is critical for AML1/ETO's activity. *Cancer Cell* 9, 249-260.
- Loose,M., Swiers,G., and Patient,R. (2007). Transcriptional networks regulating hematopoietic cell fate decisions. *Curr. Opin. Hematol.* 14, 307-314.
- Lund,A.H. and van Lohuizen,M. (2002). RUNX: a trilogy of cancer genes. *Cancer Cell* 1, 213-215.

- Lutterbach,B., Sun,D., Schuetz,J., and Hiebert,S.W. (1998a). The MYND motif is required for repression of basal transcription from the multidrug resistance 1 promoter by the t(8;21) fusion protein. *Mol. Cell Biol.* 18, 3604-3611.
- Lutterbach,B., Westendorf,J.J., Linggi,B., Patten,A., Moniwa,M., Davie,J.R., Huynh,K.D., Bardwell,V.J., Lavinsky,R.M., Rosenfeld,M.G., Glass,C., Seto,E., and Hiebert,S.W. (1998b). ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors. *Mol. Cell Biol.* 18, 7176-7184.
- Markus,M., Du,Z., and Benezra,R. (2002). Enhancer-specific modulation of E protein activity. *J. Biol. Chem.* 277, 6469-6477.
- Massari,M.E., Grant,P.A., Pray-Grant,M.G., Berger,S.L., Workman,J.L., and Murre,C. (1999). A conserved motif present in a class of helix-loop-helix proteins activates transcription by direct recruitment of the SAGA complex. *Mol. Cell* 4, 63-73.
- Mauch,P., Constine,L., Greenberger,J., Knospe,W., Sullivan,J., Liesveld,J.L., and Deeg,H.J. (1995). Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 31, 1319-1339.
- McGhee,L., Bryan,J., Elliott,L., Grimes,H.L., Kazanjian,A., Davis,J.N., and Meyers,S. (2003). Gfi-1 attaches to the nuclear matrix, associates with ETO (MTG8) and histone deacetylase proteins, and represses transcription using a TSA-sensitive mechanism. *J. Cell Biochem.* 89, 1005-1018.
- McGrath,K.E., Koniski,A.D., Malik,J., and Palis,J. (2003). Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood* 101, 1669-1676.
- McGuire,E.A., Rintoul,C.E., Sclar,G.M., and Korsmeyer,S.J. (1992). Thymic overexpression of Ttg-1 in transgenic mice results in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Mol. Cell Biol.* 12, 4186-4196.
- McKenzie,J.L., Gan,O.I., Doedens,M., Wang,J.C., and Dick,J.E. (2006). Individual stem cells with highly variable proliferation and self-renewal properties comprise the human hematopoietic stem cell compartment. *Nat. Immunol.* 7, 1225-1233.
- McNeil,S., Zeng,C., Harrington,K.S., Hiebert,S., Lian,J.B., Stein,J.L., van Wijnen,A.J., and Stein,G.S. (1999). The t(8;21) chromosomal translocation in acute myelogenous leukemia modifies intranuclear targeting of the AML1/CBFalpha2 transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 14882-14887.
- Mead,P.E., Kelley,C.M., Hahn,P.S., Piedad,O., and Zon,L.I. (1998). SCL specifies hematopoietic mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development* 125, 2611-2620.

- Mead,P.E., Deconinck,A.E., Huber,T.L., Orkin,S.H., and Zon,L.I. (2001). Primitive erythropoiesis in the *Xenopus* embryo: the synergistic role of LMO-2, SCL and GATA-binding proteins. *Development* 128, 2301-2308.
- Medvinsky,A. and Dzierzak,E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897-906.
- Meier,N., Krpic,S., Rodriguez,P., Strouboulis,J., Monti,M., Krijgsveld,J., Gering,M., Patient,R., Hostert,A., and Grosveld,F. (2006). Novel binding partners of Ldb1 are required for haematopoietic development. *Development* 133, 4913-4923.
- Melnick,A.M., Westendorf,J.J., Polinger,A., Carlile,G.W., Arai,S., Ball,H.J., Lutterbach,B., Hiebert,S.W., and Licht,J.D. (2000). The ETO protein disrupted in t(8;21)-associated acute myeloid leukemia is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol. Cell Biol.* 20, 2075-2086.
- Merika,M. and Thanos,D. (2001). Enhanceosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 205-208.
- Mikkola,H.K., Klintman,J., Yang,H., Hock,H., Schlaeger,T.M., Fujiwara,Y., and Orkin,S.H. (2003). Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* 421, 547-551.
- Minegishi,N., Suzuki,N., Yokomizo,T., Pan,X., Fujimoto,T., Takahashi,S., Hara,T., Miyajima,A., Nishikawa,S., and Yamamoto,M. (2003). Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos. *Blood* 102, 896-905.
- Mouthon,M.A., Bernard,O., Mitjavila,M.T., Romeo,P.H., Vainchenker,W., and Mathieu-Mahul,D. (1993). Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood* 81, 647-655.
- Muller-Tidow,C., Steffen,B., Cauvet,T., Tickenbrock,L., Ji,P., Diederichs,S., Sargin,B., Kohler,G., Stelljes,M., Puccetti,E., Ruthardt,M., deVos,S., Hiebert,S.W., Koeffler,H.P., Berdel,W.E., and Serve,H. (2004). Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol. Cell Biol.* 24, 2890-2904.
- Nagy,Z. and Tora,L. (2007). Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* 26, 5341-5357.
- Neale,G.A., Rehg,J.E., and Goorha,R.M. (1995). Ectopic expression of rhombotin-2 causes selective expansion of CD4-CD8- lymphocytes in the thymus and T-cell tumors in transgenic mice. *Blood* 86, 3060-3071.

- Neely,K.E. and Workman,J.L. (2002). The complexity of chromatin remodeling and its links to cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1603, 19-29.
- Norton,J.D. (2000). ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 22), 3897-3905.
- Nottingham,W.T., Jarratt,A., Burgess,M., Speck,C.L., Cheng,J.F., Prabhakar,S., Rubin,E.M., Li,P.S., Sloane-Stanley,J., Kong,A.S., and de Bruijn,M.F. (2007). Runx1-mediated hematopoietic stem cell emergence is controlled by a Gata/Ets/SCL-regulated enhancer. *Blood*.
- O'Neil,J., Shank,J., Cusson,N., Murre,C., and Kelliher,M. (2004). TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB. *Cancer Cell* 5, 587-596.
- Odaka,Y., Mally,A., Elliott,L.T., and Meyers,S. (2000). Nuclear import and subnuclear localization of the proto-oncoprotein ETO (MTG8). *Oncogene* 19, 3584-3597.
- Ohneda,K. and Yamamoto,M. (2002). Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol.* 108, 237-245.
- Okuda,T., van,D.J., Hiebert,S.W., Grosveld,G., and Downing,J.R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84, 321-330.
- Ono,Y., Fukuhara,N., and Yoshie,O. (1998). TAL1 and LIM-only proteins synergistically induce retinaldehyde dehydrogenase 2 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia by acting as cofactors for GATA3. *Mol. Cell Biol.* 18, 6939-6950.
- Orkin,S.H. (1992). GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80, 575-581.
- Orkin,S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* 1, 57-64.
- Osada,H., Grutz,G., Axelson,H., Forster,A., and Rabbitts,T.H. (1995). Association of erythroid transcription factors: complexes involving the LIM protein RBTN2 and the zinc-finger protein GATA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 9585-9589.
- Ostendorff,H.P., Peirano,R.I., Peters,M.A., Schluter,A., Bossenz,M., Scheffner,M., and Bach,I. (2002). Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature* 416, 99-103.



- Pal,S., Cantor,A.B., Johnson,K.D., Moran,T.B., Boyer,M.E., Orkin,S.H., and Bresnick,E.H. (2004). Coregulator-dependent facilitation of chromatin occupancy by GATA-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 980-985.
- Palis,J. and Yoder,M.C. (2001). Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp. Hematol.* *29*, 927-936.
- Palomero,T., Odom,D.T., O'Neil,J., Ferrando,A.A., Margolin,A., Neuberg,D.S., Winter,S.S., Larson,R.S., Li,W., Liu,X.S., Young,R.A., and Look,A.T. (2006). Transcriptional regulatory networks downstream of TAL1/SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *108*, 986-992.
- Park,C., Ma,Y.D., and Choi,K. (2005). Evidence for the hemangioblast. *Exp. Hematol.* *33*, 965-970.
- Park,S.T. and Sun,X.H. (1998). The Tal1 oncoprotein inhibits E47-mediated transcription. Mechanism of inhibition. *J. Biol. Chem.* *273*, 7030-7037.
- Patterson,L.J., Gering,M., and Patient,R. (2005). Scl is required for dorsal aorta as well as blood formation in zebrafish embryos. *Blood* *105*, 3502-3511.
- Patterson,L.J., Gering,M., Eckfeldt,C.E., Green,A.R., Verfaillie,C.M., Ekker,S.C., and Patient,R. (2007). The transcription factors Scl and Lmo2 act together during development of the hemangioblast in zebrafish. *Blood* *109*, 2389-2398.
- Peault,B., Oberlin,E., and Tavian,M. (2002). Emergence of hematopoietic stem cells in the human embryo. *C. R. Biol.* *325*, 1021-1026.
- Pevny,L., Simon,M.C., Robertson,E., Klein,W.H., Tsai,S.F., D'Agati,V., Orkin,S.H., and Costantini,F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* *349*, 257-260.
- Pimanda,J.E., Ottersbach,K., Knezevic,K., Kinston,S., Chan,W.Y., Wilson,N.K., Landry,J.R., Wood,A.D., Kolb-Kokocinski,A., Green,A.R., Tannahill,D., Lacaud,G., Kouskoff,V., and Gottgens,B. (2007). Gata2, Fli1, and Scl form a recursively wired gene-regulatory circuit during early hematopoietic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 17692-17697.
- Porcher,C., Swat,W., Rockwell,K., Fujiwara,Y., Alt,F.W., and Orkin,S.H. (1996). The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* *86*, 47-57.
- Porcher,C., Liao,E.C., Fujiwara,Y., Zon,L.I., and Orkin,S.H. (1999). Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding. *Development* *126*, 4603-4615.

- Powell, J.A., Gardner, A.E., Bais, A.J., Hinze, S.J., Baker, E., Whitmore, S., Crawford, J., Kochetkova, M., Spendlove, H.E., Doggett, N.A., Sutherland, G.R., Callen, D.F., and Kremmidiotis, G. (2002). Sequencing, transcript identification, and quantitative gene expression profiling in the breast cancer loss of heterozygosity region 16q24.3 reveal three potential tumor-suppressor genes. *Genomics* 80, 303-310.
- Pulford, K., Lecointe, N., Leroy-Viard, K., Jones, M., Mathieu-Mahul, D., and Mason, D.Y. (1995). Expression of TAL-1 proteins in human tissues. *Blood* 85, 675-684.
- Rabbitts, T.H. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372, 143-149.
- Randall, T.D. and Weissman, I.L. (1997). Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. *Blood* 89, 3596-3606.
- Ravet, E., Reynaud, D., Titeux, M., Izac, B., Fichelson, S., Romeo, P.H., Dubart-Kupperschmitt, A., and Pflumio, F. (2004). Characterization of DNA-binding-dependent and -independent functions of SCL/TAL1 during human erythropoiesis. *Blood* 103, 3326-3335.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., and Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593-599.
- Rhoades, K.L., Hetherington, C.J., Harakawa, N., Yergeau, D.A., Zhou, L., Liu, L.Q., Little, M.T., Tenen, D.G., and Zhang, D.E. (2000). Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model. *Blood* 96, 2108-2115.
- Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Kontgen, F., Harvey, R.P., Metcalf, D., and Begley, C.G. (1995). Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 7075-7079.
- Robb, L., Elwood, N.J., Elefanty, A.G., Kontgen, F., Li, R., Barnett, L.D., and Begley, C.G. (1996). The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J.* 15, 4123-4129.
- Roberts, C.W. and Orkin, S.H. (2004). The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 133-142.
- Rochford, J.J., Semple, R.K., Laudes, M., Boyle, K.B., Christodoulides, C., Mulligan, C., Lelliott, C.J., Schinner, S., Hadaschik, D., Mahadevan, M., Sethi, J.K., Vidal-Puig, A., and O'Rahilly, S. (2004). ETO/MTG8 is an inhibitor of C/EBPbeta activity and a regulator of early adipogenesis. *Mol. Cell Biol.* 24, 9863-9872.

- Rodriguez,P., Bonte,E., Krijgsveld,J., Kolodziej,K.E., Guyot,B., Heck,A.J., Vyas,P., de,B.E., Grosveld,F., and Strouboulis,J. (2005). GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J.* 24, 2354-2366.
- Rosen,E.D. and Spiegelman,B.M. (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 145-171.
- Rossetti,S., Hoogeveen,A.T., and Sacchi,N. (2004). The MTG proteins: chromatin repression players with a passion for networking. *Genomics* 84, 1-9.
- Sacchi,N., Tamanini,F., Willemsen,R., is-Donini,S., Campiglio,S., and Hoogeveen,A.T. (1998). Subcellular localization of the oncoprotein MTG8 (CDR/ETO) in neural cells. *Oncogene* 16, 2609-2615.
- Sanchez,M.J., Bockamp,E.O., Miller,J., Gambardella,L., and Green,A.R. (2001). Selective rescue of early haematopoietic progenitors in Scl(-/-) mice by expressing Scl under the control of a stem cell enhancer. *Development* 128, 4815-4827.
- Sanchez-Garcia,I. and Rabbitts,T.H. (1994). Transcriptional activation by TAL1 and FUS-CHOP proteins expressed in acute malignancies as a result of chromosomal abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 7869-7873.
- Schessl,C., Rawat,V.P., Cusan,M., Deshpande,A., Kohl,T.M., Rosten,P.M., Spiekermann,K., Humphries,R.K., Schnittger,S., Kern,W., Hiddemann,W., Quintanilla-Martinez,L., Bohlander,S.K., Feuring-Buske,M., and Buske,C. (2005). The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *J. Clin. Invest* 115, 2159-2168.
- Schillace,R.V., Andrews,S.F., Liberty,G.A., Davey,M.P., and Carr,D.W. (2002). Identification and characterization of myeloid translocation gene 16b as a novel a kinase anchoring protein in T lymphocytes. *J. Immunol.* 168, 1590-1599.
- Shah,N.P., Lee,F.Y., Luo,R., Jiang,Y., Donker,M., and Akin,C. (2006). Dasatinib (BMS-354825) inhibits KITD816V, an imatinib-resistant activating mutation that triggers neoplastic growth in most patients with systemic mastocytosis. *Blood* 108, 286-291.
- Shen-Orr,S.S., Milo,R., Mangan,S., and Alon,U. (2002). Network motifs in the transcriptional regulation network of *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* 31, 64-68.
- Shimada,H., Ichikawa,H., Nakamura,S., Katsu,R., Iwasa,M., Kitabayashi,I., and Ohki,M. (2000). Analysis of genes under the downstream control of the t(8;21) fusion protein AML1-MTG8: overexpression of the TIS11b (ERF-1, cMG1) gene induces myeloid cell proliferation in response to G-CSF. *Blood* 96, 655-663.

- Shivdasani, R.A., Mayer, E.L., and Orkin, S.H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373, 432-434.
- Simon, M.C., Pevny, L., Wiles, M.V., Keller, G., Costantini, F., and Orkin, S.H. (1992). Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1 - mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 1, 92-98.
- Sinclair, A.M., Gottgens, B., Barton, L.M., Stanley, M.L., Pardanaud, L., Klaine, M., Gering, M., Bahn, S., Sanchez, M., Bench, A.J., Fordham, J.L., Bockamp, E., and Green, A.R. (1999). Distinct 5' SCL enhancers direct transcription to developing brain, spinal cord, and endothelium: neural expression is mediated by GATA factor binding sites. *Dev. Biol.* 209, 128-142.
- Smith, C.L. and Peterson, C.L. (2005). ATP-dependent chromatin remodeling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 65, 115-148.
- Song, W.J., Sullivan, M.G., Legare, R.D., Hutchings, S., Tan, X., Kufrin, D., Ratajczak, J., Resende, I.C., Haworth, C., Hock, R., Loh, M., Felix, C., Roy, D.C., Busque, L., Kurnit, D., Willman, C., Gewirtz, A.M., Speck, N.A., Bushweller, J.H., Li, F.P., Gardiner, K., Poncz, M., Maris, J.M., and Gilliland, D.G. (1999). Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat. Genet.* 23, 166-175.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Su, A.I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K.A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., Cooke, M.P., Walker, J.R., and Hogenesch, J.B. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 6062-6067.
- Sun, W. and Downing, J.R. (2004). Haploinsufficiency of AML1 results in a decrease in the number of LTR-HSCs while simultaneously inducing an increase in more mature progenitors. *Blood* 104, 3565-3572.
- Suzuki, A. and Shiraki, K. (2001). Tumor cell "dead or alive": caspase and survivin regulate cell death, cell cycle and cell survival. *Histol. Histopathol.* 16, 583-593.
- Swiers, G., Patient, R., and Loose, M. (2006). Genetic regulatory networks programming hematopoietic stem cells and erythroid lineage specification. *Dev. Biol.* 294, 525-540.
- Tenen, D.G. (2003). Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat. Rev. Cancer* 3, 89-101.

- Terman, J.R. and Kolodkin, A.L. (2004). Nerve links protein kinase A to plexin-mediated semaphorin repulsion. *Science* 303, 1204-1207.
- Thoren, L.A., Liuba, K., Bryder, D., Nygren, J.M., Jensen, C.T., Qian, H., Antonchuk, J., and Jacobsen, S.E. (2008). Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J. Immunol.* 180, 2045-2053.
- Tolhuis, B., Palstra, R.J., Splinter, E., Grosveld, F., and de, L.W. (2002). Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol. Cell* 10, 1453-1465.
- Tremblay, M., Herblot, S., Lecuyer, E., and Hoang, T. (2003). Regulation of pT alpha gene expression by a dosage of E2A, HEB, and SCL. *J. Biol. Chem.* 278, 12680-12687.
- Tremblay, M., Lahlil, R., Herblot, S., Lecuyer, E., and Hoang, T. (2004). Dual role of SCL in hematopoiesis. poster présenté à la retraite de l'IRIC.
- Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W., and Orkin, S.H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226.
- Tsai, F.Y. and Orkin, S.H. (1997). Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 89, 3636-3643.
- Underhill, C., Qutob, M.S., Yee, S.P., and Torchia, J. (2000). A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1. *J. Biol. Chem.* 275, 40463-40470.
- Valge-Archer, V.E., Osada, H., Warren, A.J., Forster, A., Li, J., Baer, R., and Rabbitts, T.H. (1994). The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 8617-8621.
- Valtieri, M., Tocci, A., Gabbianelli, M., Luchetti, L., Masella, B., Vitelli, L., Botta, R., Testa, U., Condorelli, G.L., and Peschle, C. (1998). Enforced TAL-1 expression stimulates primitive, erythroid and megakaryocytic progenitors but blocks the granulopoietic differentiation program. *Cancer Res.* 58, 562-569.
- Visvader, J.E., Mao, X., Fujiwara, Y., Hahm, K., and Orkin, S.H. (1997). The LIM-domain binding protein Ldb1 and its partner LMO2 act as negative regulators of erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 13707-13712.
- Visvader, J.E., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (1998). Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev.* 12, 473-479.

- Vitelli, L., Condorelli, G., Lulli, V., Hoang, T., Luchetti, L., Croce, C.M., and Peschle, C. (2000). A pentamer transcriptional complex including tal-1 and retinoblastoma protein downmodulates c-kit expression in normal erythroblasts. *Mol. Cell Biol.* *20*, 5330-5342.
- Von Bubnoff, N., Gorantla, S.H., Kancha, R.K., Lordick, F., Peschel, C., and Duyster, J. (2005). The systemic mastocytosis-specific activating cKit mutation D816V can be inhibited by the tyrosine kinase inhibitor AMN107. *Leukemia* *19*, 1670-1671.
- Vyas, P., McDevitt, M.A., Cantor, A.B., Katz, S.G., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (1999). Different sequence requirements for expression in erythroid and megakaryocytic cells within a regulatory element upstream of the GATA-1 gene. *Development* *126*, 2799-2811.
- Wadman, I., Li, J., Bash, R.O., Forster, A., Osada, H., Rabbitts, T.H., and Baer, R. (1994a). Specific in vivo association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *EMBO J.* *13*, 4831-4839.
- Wadman, I.A., Hsu, H.L., Cobb, M.H., and Baer, R. (1994b). The MAP kinase phosphorylation site of TAL1 occurs within a transcriptional activation domain. *Oncogene* *9*, 3713-3716.
- Wadman, I.A., Osada, H., Grutz, G.G., Agulnick, A.D., Westphal, H., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* *16*, 3145-3157.
- Wang, J., Hoshino, T., Redner, R.L., Kajigaya, S., and Liu, J.M. (1998). ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 10860-10865.
- Wang, J., Sauntharajah, Y., Redner, R.L., and Liu, J.M. (1999). Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer Res.* *59*, 2766-2769.
- Wang, Y.Y., Zhou, G.B., Yin, T., Chen, B., Shi, J.Y., Liang, W.X., Jin, X.L., You, J.H., Yang, G., Shen, Z.X., Chen, J., Xiong, S.M., Chen, G.Q., Xu, F., Liu, Y.W., Chen, Z., and Chen, S.J. (2005). AML1-ETO and C-KIT mutation/overexpression in t(8;21) leukemia: implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 1104-1109.
- Warren, A.J., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Evans, M.J., Smith, A.J., and Rabbitts, T.H. (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbt2 is essential for erythroid development. *Cell* *78*, 45-57.

- Wei, Y., Liu, S., Lausen, J., Woodrell, C., Cho, S., Biris, N., Kobayashi, N., Wei, Y., Yokoyama, S., and Werner, M.H. (2007). A TAF4-homology domain from the corepressor ETO is a docking platform for positive and negative regulators of transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 653-661.
- Weiss, M.J., Keller, G., and Orkin, S.H. (1994). Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev.* 8, 1184-1197.
- Weiss, M.J., Yu, C., and Orkin, S.H. (1997). Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol. Cell Biol.* 17, 1642-1651.
- Wen, J., Huang, S., Pack, S.D., Yu, X., Brandt, S.J., and Noguchi, C.T. (2005). Tal1/SCL binding to pericentromeric DNA represses transcription. *J. Biol. Chem.* 280, 12956-12966.
- Wildonger, J. and Mann, R.S. (2005). Evidence that nervy, the Drosophila homolog of ETO/MTG8, promotes mechanosensory organ development by enhancing Notch signaling. *Dev. Biol.* 286, 507-520.
- Wood, J.D., Nucifora, F.C., Jr., Duan, K., Zhang, C., Wang, J., Kim, Y., Schilling, G., Sacchi, N., Liu, J.M., and Ross, C.A. (2000). Atrophin-1, the dentato-rubral and pallido-luysian atrophy gene product, interacts with ETO/MTG8 in the nuclear matrix and represses transcription. *J. Cell Biol.* 150, 939-948.
- Xu, Z., Huang, S., Chang, L.S., Agulnick, A.D., and Brandt, S.J. (2003). Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation. *Mol. Cell Biol.* 23, 7585-7599.
- Xu, Z., Meng, X., Cai, Y., Liang, H., Nagarajan, L., and Brandt, S.J. (2007). Single-stranded DNA-binding proteins regulate the abundance of LIM domain and LIM domain-binding proteins. *Genes Dev.* 21, 942-955.
- Yan, M., Burel, S.A., Peterson, L.F., Kanbe, E., Iwasaki, H., Boyapati, A., Hines, R., Akashi, K., and Zhang, D.E. (2004). Deletion of an AML1-ETO C-terminal NcoR/SMRT-interacting region strongly induces leukemia development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 17186-17191.
- Yan, M., Kanbe, E., Peterson, L.F., Boyapati, A., Miao, Y., Wang, Y., Chen, I.M., Chen, Z., Rowley, J.D., Willman, C.L., and Zhang, D.E. (2006). A previously unidentified alternatively spliced isoform of t(8;21) transcript promotes leukemogenesis. *Nat. Med.* 12, 945-949.

- Yoder, M.C., Hiatt, K., and Mukherjee, P. (1997). In vivo repopulating hematopoietic stem cells are present in the murine yolk sac at day 9.0 postcoitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 6776-6780.
- Yoon, H.G., Chan, D.W., Huang, Z.Q., Li, J., Fondell, J.D., Qin, J., and Wong, J. (2003). Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *EMBO J.* 22, 1336-1346.
- Yuan, Y., Zhou, L., Miyamoto, T., Iwasaki, H., Harakawa, N., Hetherington, C.J., Burel, S.A., Lagasse, E., Weissman, I.L., Akashi, K., and Zhang, D.E. (2001). AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10398-10403.
- Zhang, J., Hug, B.A., Huang, E.Y., Chen, C.W., Gelmetti, V., Maccarana, M., Minucci, S., Pelicci, P.G., and Lazar, M.A. (2001). Oligomerization of ETO is obligatory for corepressor interaction. *Mol. Cell Biol.* 21, 156-163.
- Zhang, J., Kalkum, M., Chait, B.T., and Roeder, R.G. (2002). The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Mol. Cell* 9, 611-623.
- Zhang, J., Kalkum, M., Yamamura, S., Chait, B.T., and Roeder, R.G. (2004). E protein silencing by the leukemogenic AML1-ETO fusion protein. *Science* 305, 1286-1289.



## **2 ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis**

**ETO2 COORDINATES CELLULAR PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION DURING  
ERYTHROPOIESIS**

Nicolas Goardon<sup>\*1</sup>, Julie A. Lambert<sup>\*2</sup>, Patrick Rodriguez<sup>3</sup>, Philippe Nissaire<sup>2</sup>, Sabine Herblot<sup>2</sup>, Pierre Thibault<sup>2</sup>, Dominique Dumenil<sup>1</sup>, John Strouboulis<sup>3</sup>, Paul-Henri Romeo<sup>#1</sup>,  
and Trang Hoang<sup>#2</sup>.

Article publié dans EMBO Journal (2006) 25, 357-366.

\* et #: contribution égale des auteurs

1. Institute of Research in Immunology and Cancer (I.R.I.C.) – Pharmacology, Chemistry, Biochemistry and Molecular Biology Departments, University of Montreal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7
2. Department of Cell Biology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands
3. Department of Cell Biology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

## 2.1 Contribution des co-auteurs

Moi (J.A .L) et Nicolas Goardon (N.G.) sommes co-premiers auteurs de cet article. Notre contribution est égalitaire, tant au niveau de l'écriture, des expériences réalisées que des analyses et discussions. L'ordre des co-premiers auteurs a été établi selon l'ordre alphabétique.

### Contribution détaillée de chaque auteur :

J.A.L: design expérimental, réalisation des expériences et analyse des données (fig.2, fig.3, fig.4A, B et D, fig.6B-C), rédaction du manuscrit.

N.G: design expérimental, réalisation des expériences et analyse des données (fig.1, fig.4C, fig.5, fig.6 A et D, fig.7), rédaction du manuscrit.

P.R: Analyse de spectrométrie de masse (fig.1A)

P.N.: aide technique

S.H: design expérimental, aide technique et discussion

P.T: Analyse de spectrométrie de masse

D.D : discussion et analyse des résultats

J.S : spectrométrie de masse, discussion et analyse des résultats

P.-H. R. : Design expérimental, analyse des données et rédaction du manuscrit

T.H : Design expérimental, analyse des données et rédaction du manuscrit

## 2.2 Abstract

The passage from proliferation to terminal differentiation is critical for normal development and is often perturbed in malignancies. To define the molecular mechanisms that govern this process during erythropoiesis, we have used tagging/proteomics approaches and characterized protein complexes nucleated by TAL-1/SCL, a basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor that specifies the erythrocytic lineage. In addition to known TAL-1 partners, GATA-1, E2A, HEB, LMO2 and Ldb1, we identify the ETO2 repressor as a novel component recruited to TAL-1 complexes through interaction with E2A/HEB. Ectopic expression and siRNA knock down experiments in hematopoietic progenitor cells show that ETO2 actively represses erythroid TAL-1 target genes and governs the expansion of erythroid progenitors. At the onset of erythroid differentiation a change in the stoichiometry of ETO2 within the TAL-1 complex activates the expression of known erythroid-specific TAL-1 target genes and of Gfi-1b and p21<sup>Cip</sup>, encoding two essential regulators of erythroid cell proliferation. These results suggest that the dynamics of ETO2 recruitment within nuclear complexes couple cell proliferation to cell differentiation and determine the onset of terminal erythroid maturation

## 2.3 Introduction

The variety of mature hematopoietic cells that typically express a set of highly specialised proteins are generated from an hematopoietic stem cell (HSC) that undergoes lineage specification and differentiation. This process is coordinated at the molecular level by evolutionary conserved transcription factors, as typified by the importance of GATA factors and their ortholog *srp* in blood cell development in vertebrates and in *Drosophila*, respectively (Cantor and Orkin, 2002). These sequence-specific DNA binding factors typically act as transcriptional activators or can modulate gene expression through long-range interaction. One such example is the regulation of erythroid-specific gene expression by SCL/TAL-1, a member of the helix-loop-helix family of transcription factors, that either directly activates target gene expression (Lahlil et al., 2004; Xu et al., 2003) or is involved in opening the  $\alpha$ -globin locus via binding to far upstream regulatory sequences without driving transcription (Anguita et al., 2004). In this context, definitive transcriptional activation requires extended chromatin remodeling and could only be attained in mature hematopoietic cells upon additional binding of stage-specific transactivators and/or alleviation of an active repression that maintains these genes inactive prior to differentiation while keeping the locus transcriptionally competent (Smale, 2003).

The composition of transcription factor complexes bound to lineage specific genes undergoes dynamic change as HSCs differentiate (Anguita et al., 2004; Bottardi et al., 2003). In multipotent progenitors, the mouse  $\alpha$ -globin gene cluster is first activated by protein complexes containing GATA-2, NF-E2 and TAL-1 at two DNase I-hypersensitive sites (Anguita et al., 2004). As erythroid differentiation proceeds, additional DNase-I hypersensitive sites are observed in which GATA-1 takes over GATA-2 to nucleate protein complexes that again contain NF-E2 and TAL-1. Interactions between these regulatory sequences and the  $\alpha$ -globin genes promoters result in an erythroid-specific domain of histone hyperacetylation where active transcription can occur. The stoichiometry of the transcription factor complexes is also of critical importance for lineage specific gene

expression. For example, members of the bHLH family form homo- and heterodimers and the dosage of these proteins (E2A, HEB and E2-2) as well of TAL-1 has been shown to shape biological outcome in lymphoid lineages (Lecuyer and Hoang, 2004).

The production of erythrocytes is the largest quantitative output of the hematopoietic system with estimated production rates of  $2 \times 10^{11}$  erythrocytes per day. Yet, the frequency of committed granulocyte-macrophage progenitors exceeds by three-fold that of committed erythroid progenitors in the bone marrow. This imbalance is compensated by a high proliferative index in the late transitional stages of erythroid development (Gregory and Eaves, 1978; Iscove, 1977). The cell cycle time of pro-erythroblasts is estimated to be 6-7 h, and this property under steady state conditions is unique in the adult and more closely resembles that of embryonic cells. How cell differentiation and activation of specific gene expression programmes are coordinated with cell growth remains to be documented, despite a detailed knowledge of the transcription factor network that governs lineage gene expression (Cantor and Orkin, 2002).

TAL-1 is necessary for the establishment of the hematopoietic system (Porcher et al., 1999; Ravet et al., 2004; Robb et al., 1996; Shivdasani et al., 1995). Conditional deletion of the *tal-1* gene in the mouse reveals its critical importance in the formation of the erythroid and megakaryocytic lineages (Hall et al., 2003; Mikkola et al., 2003). At the molecular level, TAL-1 can activate or repress transcription (Begley and Green, 1999), but the factors that are recruited in TAL-1-nucleated complexes to mediate these opposing functions remain largely unknown. TAL-1 has been shown to assemble a multifactorial complex containing E2A, LMO2, Ldb1 and GATA-1 (Wadman et al., 1997) in erythroid committed cells to activate the expression of terminally expressed erythroid specific genes (Lahlil et al., 2004; Xu et al., 2003) while in CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors, a GATA-2 variant of this TAL-1 complex activates c-kit transcription (Lecuyer et al., 2002). Furthermore, the recruitment of Ldb1 in TAL-1-dependent transcriptional regulation (Xu et al., 2003) links TAL-1 complexes to the establishment of chromatin domains through Ldb-1 protein partners (Torigoi et al., 2000).

To determine how TAL-1 can regulate gene expression as hematopoietic progenitors progress through the erythroid lineage, we have undertaken proteomic approaches to isolate and characterize TAL-1 complexes. We show here that the ETO2 repressor is a *bona fide* participant of the TAL-1-containing complex that can repress its transcriptional activity. Furthermore, our functional studies indicate that ETO2 dynamic fluctuations within the TAL-1 complex contribute to the precise timing of erythroid-specific gene expression and that the ETO2 expression level regulates the expansion of erythroid progenitors.

## 2.4 Results

### 2.4.1 ETO2 is part of a nuclear TAL-1-containing complex in erythroid cells

To identify the proteins that are associated with nuclear TAL-1 in erythroid cells, we purified TAL-1 complexes using *in vivo* biotinylation (de Boer et al., 2003). The TAL-1-biotin tag was expressed from a lentiviral vector in which the EGFP-BirA fusion protein was translated via an IRES (Supplementary data, Figure S 2-1), thus allowing for the selection of cells expressing the TAL-1-biotin tag at a level similar to the endogenous TAL-1 protein using cell sorting based on EGFP. The TAL-1-biotin tag retained its nuclear localization, specific DNA binding and trans-activation properties (data not shown). This TAL-1-biotin tag protein was expressed in mouse erythroleukemic (MEL) cells. Nuclear extracts were prepared from non-induced or induced MEL cells under mild conditions and proteins bound to the biotinylated TAL-1 protein were characterized in two different experiments.

In addition to all known TAL-1 partners, novel protein interactions were identified (Figure 2-1A). Two members of single-stranded DNA binding proteins (SSDP) were pulled down by the TAL-1 bait, SSDP1, 2 and 3. Interestingly, *ssdp1* in *Drosophila* physically and functionally interacts with Chip, the Ldb1 ortholog, in wing development, suggesting that SSDP1 may also associate with Ldb1 to regulate the function of the TAL-1 complex in hematopoiesis. Two members of the ETO (eight twenty-one) family were also identified, ETO2 and MTGR1. ETO2 is a transcriptional repressor that recruits several members of the HDAC family (Melnick et al., 2000) and, consistent with these interactions, we found HDAC1 and HDAC2 associated with the TAL-1-biotin tag protein in undifferentiated MEL cells only (Figure 2-1A). As ETO2 could modulate the transcriptional activities of numerous DNA-binding proteins, we further investigated the function(s) mediated by ETO2 in TAL-1 nuclear complex(es).



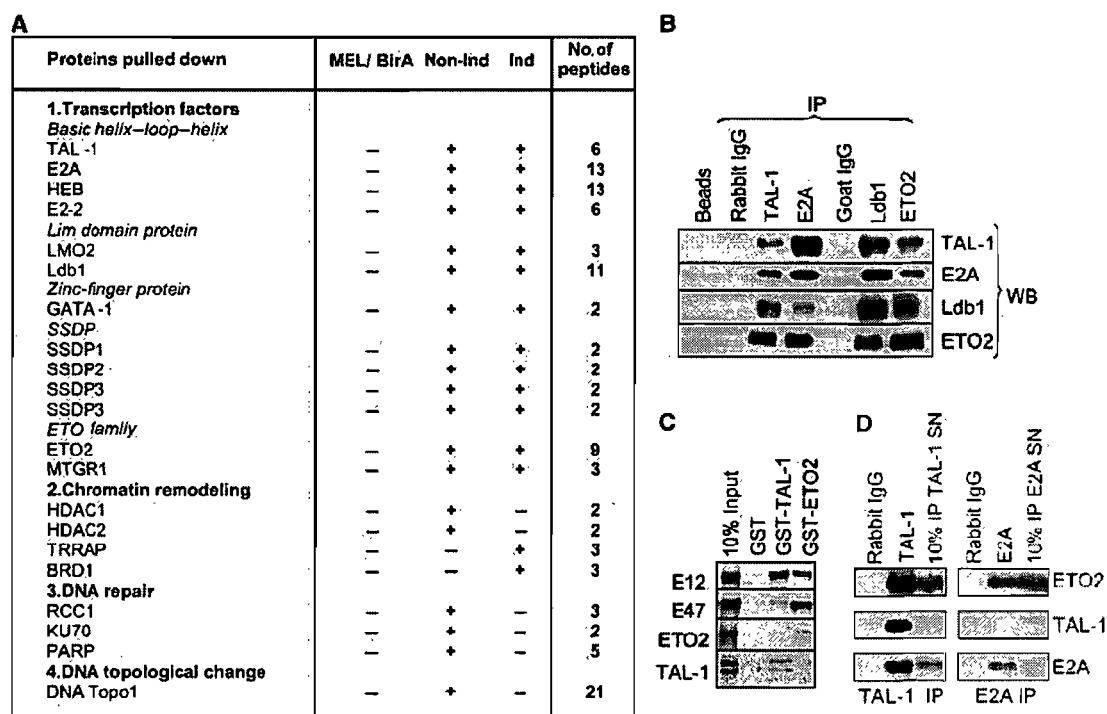


Figure 2-1. TAL-1/ETO2 interaction in erythroid cells

(A) Proteins identified by LC-MS/MS in bio-TAL-1 pulldown experiments in non induced (Non-Ind) and induced (Ind) MEL cells. MEL/BirA represented the proteins pulldown using MEL cells expressing only BirA. The number of peptides identified by mass spectrometry is indicated. (B) Co-immunoprecipitation of TAL-1, E2A, Ldb1 and ETO2. Nuclear extracts from MEL cells were immunoprecipitated with the indicated antibodies (IP) and the precipitated proteins were revealed by immunoblotting using antibodies shown (WB). (C) ETO2 interacts *in vitro* with E12 or E47 but not with TAL-1. GST-pull down analysis was performed using the indicated GST and <sup>35</sup>S-labeled TAL-1, E12, E47 or ETO2. The signal obtained with 10% of the input is shown. (D) ETO2 is associated with TAL-1/E2A and with E2A in distinct complexes. MEL cell nuclear extracts were subjected to sequential immunoprecipitation using first TAL-1 antibodies (TAL-1 IP) and second, E2A antibodies (E2A IP). Preimmune rabbit IgG serve as negative controls. Both the indicated immunoprecipitates and 10% of the respective supernatants were used for Western blot analysis.

### **2.4.2 ETO2 is associated with E2A in TAL-1-containing nuclear complexes**

We studied the specificity of TAL-1 interactions using co-immunoprecipitation experiments. TAL-1-, E2A-, Ldb1- and ETO2-specific antibodies were used to immunoprecipitate MEL nuclear extracts and the immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blotting. As shown in Figure 2-1B, Ldb1, ETO2, E2A and TAL-1 co-immunoprecipitate, suggesting that they could be part of the same nuclear complex. In GST pull-down assays, ETO2 interacts with E2A and HEB, but not TAL1 (Figure 2-1C). These results indicate that ETO2 is part of a TAL-1 nuclear complex in erythroid cells through E2A or HEB interaction. Finally, to determine how ETO2 is partitioned in TAL-1- and non TAL-1-containing complexes, we performed sequential immunoprecipitation of MEL cell nuclear extracts under conditions where both TAL-1 and E2A immunodepletion were complete with their respective antibodies. As illustrated in Figure 2-1D, part of ETO2 is associated with E2A in both TAL-1-containing complex(es) and TAL-1-independent complexes in erythroid cells.

### **2.4.3 The ratio of activator to repressor determines the transcriptional output of the TAL-1 complex during erythroid differentiation**

To define the composition of the TAL-1 complex bound to DNA, we optimized a DNA binding assay based on immobilized DNA templates, using sequences of the GPA promoter that were shown to be necessary and sufficient to recruit a TAL-1-containing complex (Lahlil et al., 2004). In this assay, TAL-1, E2A, HEB and ETO2 association with the DNA template was comparable, whereas E2-2 binding was lower and Ldb1 binding was higher (Figure 2-2A). We also found high GATA-1 binding, consistent with its role in tethering the TAL-1/GATA-1 complex to DNA and with the requirement in the integrity of the two GATA binding sites and the E box for recruitment of the TAL-1 complex to the DNA template (Figure 2-2A). In summary, our results indicate that the ETO2 is recruited to the GPA promoter by the TAL-1 complex.

ETO2 is known as a transcriptional repressor while TAL-1 is a positive regulator of erythroid gene expression. Thus, the presence of ETO2 within the TAL-1 complex might indicate an active repression of TAL-1 target genes during the early stages of erythropoiesis. In transient assays using a reporter gene driven by the GPA promoter (Lahlil et al., 2004), there was an eight-fold activation of the GPA promoter by the TAL-1 complex and ETO2 imposed a dose-dependent repression of this activity (Figure 2-2B) without interfering with the expression levels of the proteins present in the TAL-1 complex (Figure 2-2C). These data indicate that ETO2 represses the transcriptional activity of the TAL-1 complex bound to the GPA promoter, and that this repression depends on the relative dosage of TAL-1 and its partners over that of ETO2.

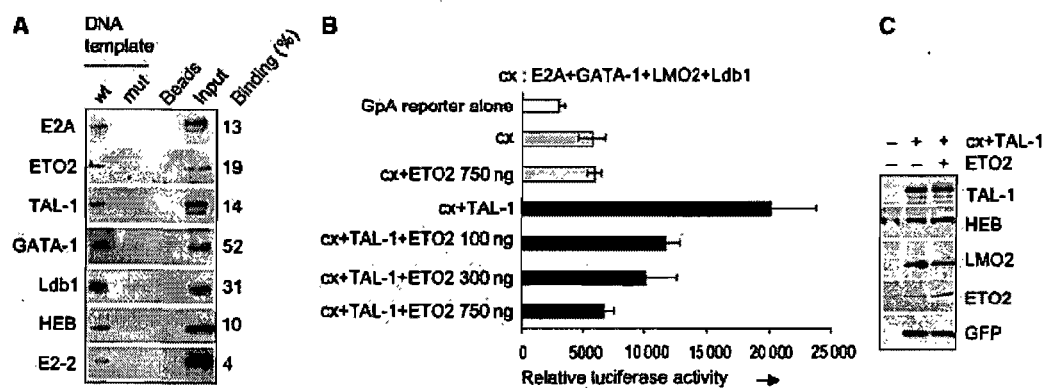


Figure 2-2. ETO2 and known TAL-1 partners bind the GPA promoter and ETO2 represses the transcriptional activity of TAL-1 on this promoter.

(A) Nuclear extracts from TF-1 cells were incubated with the immobilized wild type GPA promoter (wt), with its E box-GATA mutant version (mut), or with beads alone as a negative control. Bound proteins were eluted and revealed by Western blot. Input represents 30% of each binding assay. (B) A GPA reporter plasmid was transfected with expression plasmids for E2A, GATA-1, Ldb1 and LMO2 alone or with a TAL-1 expression vector in NIH 3T3 cells. ETO2 was co-transfected with the above plasmids at the indicated concentrations. Data are the average of three independent experiments and error bars denote S.D. (C) The expression level of transfected proteins was verified by Western blotting.

To assess the dynamics of TAL-1-associated proteins on DNA during erythroid differentiation, we used TF-1 cells that remain undifferentiated in the presence of GM-CSF. When these cells are switched to an Epo-containing medium, GPA mRNA levels increased on day 1 and subsequently remained high (Figure 2-3A), coinciding with increased TAL-1 and HEB protein levels, while ETO2 protein levels were not induced on day 1 and showed modest variations thereafter (Figure 2-3A). We determined the kinetics of binding of TAL-1, ETO2 and HEB to GPA regulatory sequences using our *in vitro* binding assay on immobilized DNA templates (Figure 2-3B) and *in vivo* chromatin immunoprecipitation (ChIP) (Figure 2-3C). Coinciding with the timing of upregulation of GPA mRNA, the TAL-1/ETO2 ratio was reproducibly increased more than 6-fold on day 1 of Epo exposure, and remained constant afterwards (Figure 2-3B). In contrast, the TAL-1/HEB ratio did not fluctuate significantly within the same time frame (Figure 2-3B). Together, these data indicate a strong correlation between the ratio of activator to repressor and the expression of the endogenous GPA target gene.

We next quantitated the occupancy of the GPA promoter by TAL-1, ETO2 and the extent of acetylated histone H3 in TF-1 cells cultured with GM-CSF or Epo. We also assessed the HS-40 of the human  $\alpha$ -globin gene, since members of the TAL-1 complex were previously shown to occupy the corresponding murine HS-26 sequence in undifferentiated cells, prior to  $\alpha$ -globin gene expression (Anguita et al., 2004). In the presence of GM-CSF, GPA promoter and  $\alpha$ -globin HS-40 sequences were efficiently brought down by antibodies against TAL-1, ETO2, HEB or E2A (Figure 2-3C, left panel), but not acetylated H3 (Figure 2-3D). We then calculated the ratio of DNA-bound proteins when TF-1 cells were switched to Epo-containing medium (Figure 2-3C, right panel). The ratio of TAL-1 to ETO2 at the GPA promoter was increased twenty-fold, while the TAL-1/HEB or TAL-1/E2A ratio did not vary significantly. We finally studied local histone H3 acetylation as it correlates with the induction of gene expression (Reinke and Horz, 2003), and found that, on erythroid differentiation, H3 acetylation increased at the  $\alpha$ -globin HS-40 and, to a greater extent, at the GPA promoter (Figure 2-3D). These ChIP experiments

indicate that TAL-1, HEB, E2A and ETO2 are specifically associated with the GPA promoter and the  $\alpha$ -globin locus in cells when these genes are poorly transcribed. The induction of erythroid differentiation with Epo changes the ratio of TAL-1/HEB to ETO2 occupancy of these regulatory sequences in favor of TAL-1/HEB, together with increased histone H3 acetylation as well as increased transcription of the GPA and  $\alpha$ -globin genes.

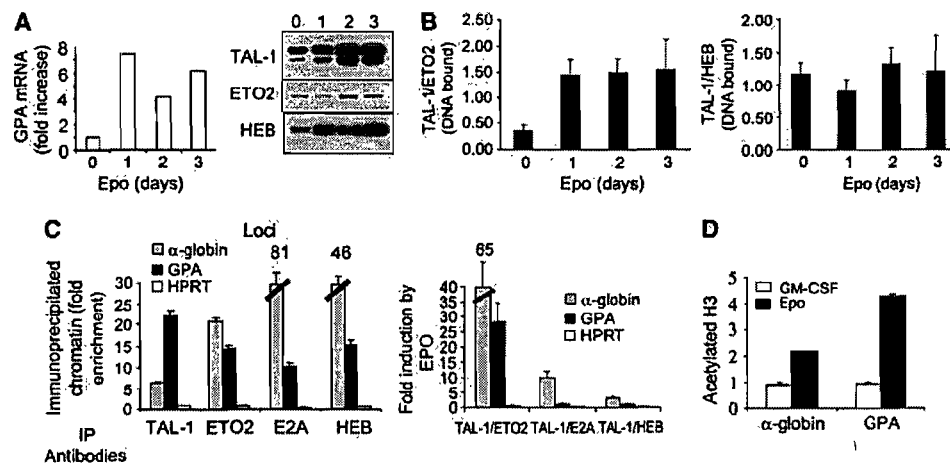


Figure 2-3. Stochiometry of ETO2 and TAL-1 binding to the GPA promoter during erythroid differentiation.

(A) Kinetics of GPA mRNA levels, assessed by real time RT-PCR (left panel) and of TAL-1, HEB and ETO2 protein levels (right panel) following TF-1 cell exposure to Epo. (B) The ratio of TAL-1 (activator) over ETO2 (repressor) bound to the immobilized GPA promoter increases with erythroid differentiation in Epo-induced TF-1 cells, while the ratio of TAL-1 over HEB (activator) remains unchanged. (C) TF-1 cell chromatin extracts were subjected to immunoprecipitations with the indicated antibodies (IP) and species-matched control IgG. DNA from immunoprecipitated chromatin was subjected to PCR analysis to detect the presence of the GPA and HPRT promoter sequences, as well as the core sequence of the  $\alpha$ -globin HS-40. Fold enrichments were calculated as described in Materials and Methods. The left panel shows ChIP results in uninduced cells and the right panel illustrates ratio changes in favor of activator (TAL-1 and E2A, HEB) over repressor (ETO2) bound to GPA and  $\alpha$ -globin HS-40 during Epo stimulation of TF-1 cells. (D) Acetylated histone H3 is induced by Epo at the GPA promoter and the  $\alpha$ -globin HS-40. All ChIP data are typical of two independent experiments.

#### **2.4.4 Overexpression of ETO2 represses the expression of endogenous TAL-1 target genes during erythroid differentiation**

To address the functional impact of the stoichiometry of ETO2 and TAL-1/HEB or TAL-1/E2A, we first overexpressed ETO2 in three model cell lines that mimic different steps of erythropoiesis and in primary hematopoietic cells. TF-1 and UT-7 cell lines are dependent on Epo for differentiation (TF-1) or proliferation (UT-7) and MEL cells are considered as a cellular model of terminal erythroid differentiation (Figure 2-4). In these models, we studied the expression of the *GPA* and the *band 4.2* gene as these genes are known to be direct TAL-1 target genes, whereas the functional effect of TAL-1 on  *$\alpha$ -globin* gene expression is not documented.

In TF-1 and UT-7 cells, ETO2 overexpression nearly abrogated the induction of GPA (TF-1) or its expression (UT-7) on Epo exposure (Figure 2-4A and data not shown). Decreased expression was associated with an imbalance of ETO2 over E2A or HEB in favor of ETO2 at the GPA locus, while the ratio of TAL-1 over E2A or HEB remained unchanged (Figure 2-4B), as revealed by ChIP. In MEL cells, ETO2 overexpression greatly reduced the induction of the *band 4.2* gene by DMSO (Figure 2-4C). These cells nonetheless underwent terminal maturation and became fully hemoglobinized (Figure 2-4C, right panel). Finally, we expressed ETO2 in normal fetal liver cells taken at E12.5 and found that the expression of the GPA complex recognized by the TER119 monoclonal antibody was nearly abrogated (Figure 2-4D). While we cannot exclude the possibility that ETO2 interferes with the differentiation of fetal liver cells, studies in MEL cells suggest that decreased *band 4.2* gene expression was due to a direct inhibition of TAL-1 transcriptional activity by ETO2 and not to differentiation blockade.

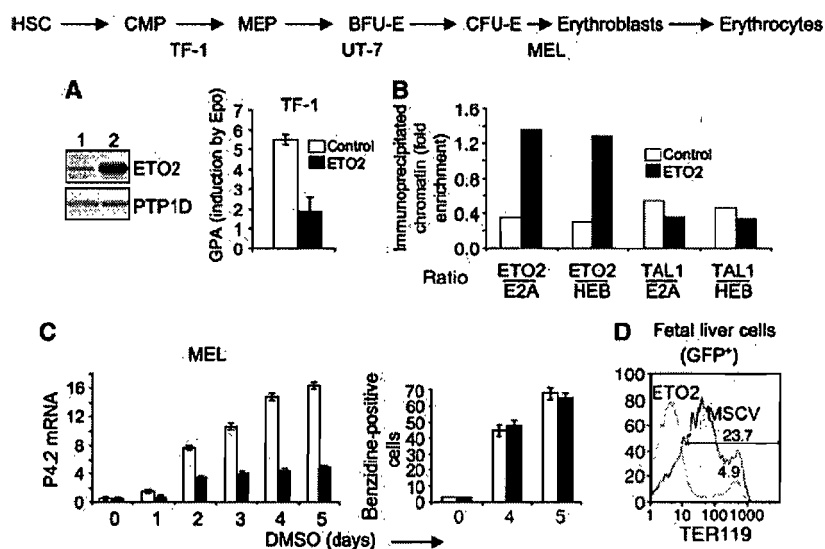


Figure 2-4. ETO2 overexpression inhibits the expression of TAL-1 target genes.

(A) ETO2 overexpression in TF-1 cells. Western blot indicates a 5.4 fold higher ETO2 level compared to the endogenous level. GPA mRNA levels were quantified in TF1 cells before or 5 days after Epo addition. Open columns, mock infected TF1 and black columns, ETO2 overexpressing TF1. (B) ETO2 overexpression results in an imbalance of ETO2 over E2A or HEB, but without affecting the ratio of TAL1 over E2A or HEB at the GPA locus. ChIP results are expressed as in Figure 2-3C. (C) MEL cells expressing ETO2 or the control GFP vector were induced by DMSO to undergo terminal erythroid differentiation. Band 4.2 mRNA levels in control cells (open columns) and ETO2 expressing cells (black columns) harvested at 24 h intervals were quantified (left panel). In parallel, hemoglobinization was assessed by benzidine staining (right panel). Data shown are the average of three independent experiments and error bars denote S.D. (D) Fetal liver cells were transduced with the empty MSCV-GFP vector (thin line) or an ETO2 expressing vector (thick line). Cells were harvested immediately after infection and analyzed for TER119 fluorescence in the GFP<sup>+</sup> fraction (right panel), which was in the range of 20-50% (not shown). Data are typical of three independent experiments.

### 2.4.5 Inhibition of ETO2 expression accelerates the onset of expression of TAL-1 target genes during terminal erythroid differentiation

Conversely, ETO2 knockdown using siRNA in UT-7 cells enhanced GPA mRNA levels (Figure 2-5A). In purified mouse primary erythroid cell populations, TAL-1 and ETO2 are co-expressed in pro-erythroblasts (E1). TAL-1 mRNA levels then increase two-fold with differentiation, while ETO2 mRNA levels sharply drop as the cells engage to the next stage (basophilic erythroblast, E2), indicating that ETO2 expression is switched off with terminal maturation in the erythroid lineage (Supplementary data, Figure S 2-2). This decrease in ETO2 expression was also observed during terminal erythroid differentiation of human erythroid progenitors, while TAL-1 expression showed little variation and E2A expression was increased (Figure 2-5B).

In MEL cells, the ETO2 siRNA decreased the amount of ETO2 within the TAL-1 complex without affecting the levels of E2A bound to TAL-1 (Figure 2-5C, left panel). Decreased ETO2 level was associated with enhanced band 4.2 expression on day one, that is, when the transcriptional activity of *band 4.2* gene is low in control cells (Figure 2-5C, middle panel). However, when *band 4.2* gene is normally activated from day 2 to 4 of DMSO exposure, coinciding with decreased ETO2 expression (not shown), its expression was not affected by further lowering ETO2 levels. Similarly, in primary human erythroid progenitors, ETO2 siRNA delivery accelerated the kinetics of upregulation of GPA by Epo without further elevating its final levels (Figure 2-5D). Contrary to the effects of ETO2 siRNA, E12 overexpression in CD36<sup>+</sup> cells did not accelerate GPA expression (Figure 2-5E), suggesting that E12 is not limiting and that E2A is not sequestered by ETO2. Together, these data indicate that the relative amount of ETO2 within the TAL-1 complex determines the outcome in the transcriptional activity of essential TAL-1 target genes and the timing of their expression.



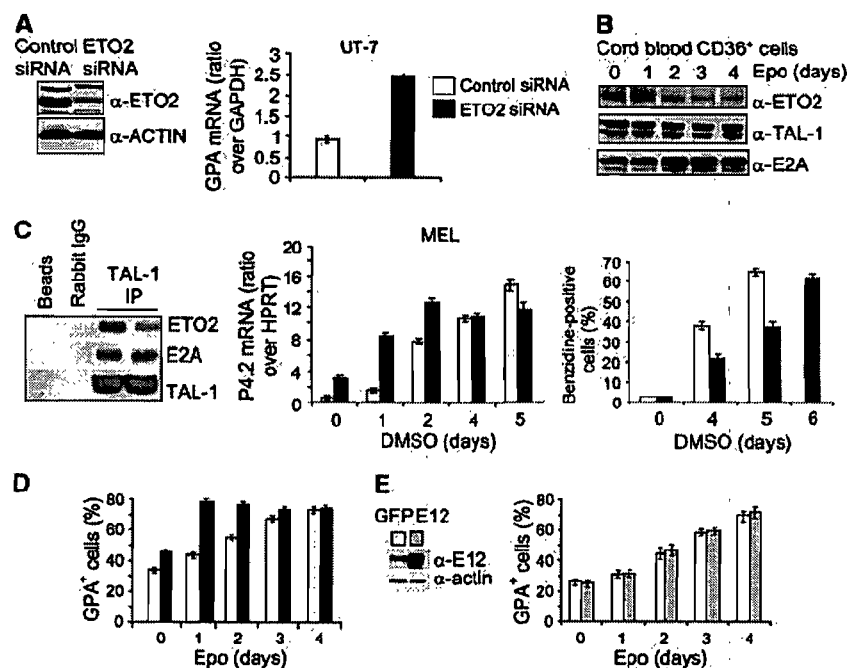


Figure 2-5. The relative amount of ETO2 in the TAL-1-containing complex determines the timing of expression of TAL-1 target genes.

(A) An siRNA directed against human ETO2 decreased ETO2 protein levels in UT-7 cells (left panel, lane 2) as compared to cells expressing a control siRNA (left panel, lane 1), without affecting  $\alpha$ -actin levels. GPA mRNA levels were quantified in control cells (right panel, open column) and in cells expressing the ETO2 siRNA (right panel, black column). (B) Kinetics of ETO2, TAL-1 and E2A protein levels during terminal erythroid differentiation of human CD36<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> cells as revealed by immunoblotting. (C) The amounts of ETO2 and E2A associated with TAL-1 in control or ETO2 directed siRNA expressing MEL cells were assessed by Western blot analysis after TAL-1 immunoprecipitation (left panel). Preimmune rabbit IgG and protein G beads serve as negative controls. MEL cells expressing a control (open columns) or an ETO2 siRNA (black columns) were induced to undergo terminal erythroid differentiation. Band 4.2 mRNA level was assessed every day (middle panel) and hemoglobinization determined as in Figure 2-4C (right panel). (D) Human CD34<sup>+</sup>CD36<sup>+</sup> erythroid progenitors expressing an ETO2 (black columns) or a control (open column) siRNA were induced to terminal erythroid differentiation with Epo and analysed for GPA<sup>+</sup> cells. (E) Human CD34<sup>+</sup>CD36<sup>+</sup> erythroid progenitors expressing E12 (grey columns) or GFP (open column) were induced to terminal erythroid differentiation with Epo and analysed for GPA<sup>+</sup> cells. Data shown in (C)-(E) are the average of three independent experiments and error bars denote S.D.

### 2.4.6 ETO2 regulates the Epo-dependent proliferation of erythroid cells and the expansion of human erythroid progenitors

During erythropoiesis, a high proliferation rate is observed in erythroid precursors (CFU-Es) and early erythroblasts (E1/E2) (Gregory and Eaves, 1978), while proliferation decreases sharply in late erythroblasts (E3) and ceases with final maturation (E4) (Asari et al., 2005). Strikingly, the ETO2 siRNA induced growth arrest in UT-7 cells (Figure 2-6A, left panel) and decreased the proliferation of differentiating MEL cells (Figure 2-6A, right panel) in the absence of apoptotic features (Supplementary data, Figure S 2-3). Decreased growth in MEL cells resulted in delayed hemoglobinization, which was offset by one day compared to control cells, despite accelerated band 4.2 expression (Figure 2-5C, middle and right panels). These observations indicate that ETO2 may regulate the proliferation of erythroid cells. We therefore investigated the molecular pathways that link ETO2/TAL-1 to cell proliferation.

Gfi-1b is a zinc-finger repressor that governs the proliferation of erythroid progenitors *in vitro* (Garcon et al., 2005) and is essential for erythroid lineage cells *in vivo* (Garcon et al., 2005; Saleque et al., 2002). As Gfi-1b (Saleque et al., 2002) and TAL-1 deficiencies (Hall et al., 2003; Mikkola et al., 2003) similarly disrupt the formation of erythroid cells *in vivo* and as the Gfi-1b promoter harbours a TAL-1 DNA binding sequence located at – 245 (Huang et al., 2004), we hypothesized that Gfi-1b might be directly regulated by the TAL-1/ETO2-containing complex. ChIP reveals that the Gfi-1b promoter is occupied by TAL-1 and ETO2 and the stoichiometry of the complex changes in favor of TAL1 after Epo induction (Figure 2-6B). Thus, the induction of erythroid differentiation with Epo changes the ratio of TAL-1 to ETO2 occupancy of the Gfi-1b promoter in favor of TAL-1, together with increased histone H3 acetylation (Figure 2-6B) and increased transcription (not shown).

P21, a cyclin-dependent kinase inhibitor and G1 checkpoint regulator, is upregulated in chromophilic erythroblasts (E3) exactly when cell cycle decreases (data not

shown). The p21 promoter contains several E boxes that could potentially recruit the ETO2/TAL-1 complex. As observed with Gfi1b, the p21 promoter is also occupied by TAL-1 and ETO2 (Figure 2-6C, left panel), and Epo induction changes the balance in favor of TAL1. Similarly, acetylated histone H3 increases at this locus associated with increased transcription (not shown). In accordance with these results, an ETO2 directed siRNA increased Gfi-1b and p21 mRNA levels (Figure 2-6D). Together, our observations indicate that ETO2 favors the expansion of erythroid progenitors and suggest a molecular pathway involving Gfi-1b and p21.

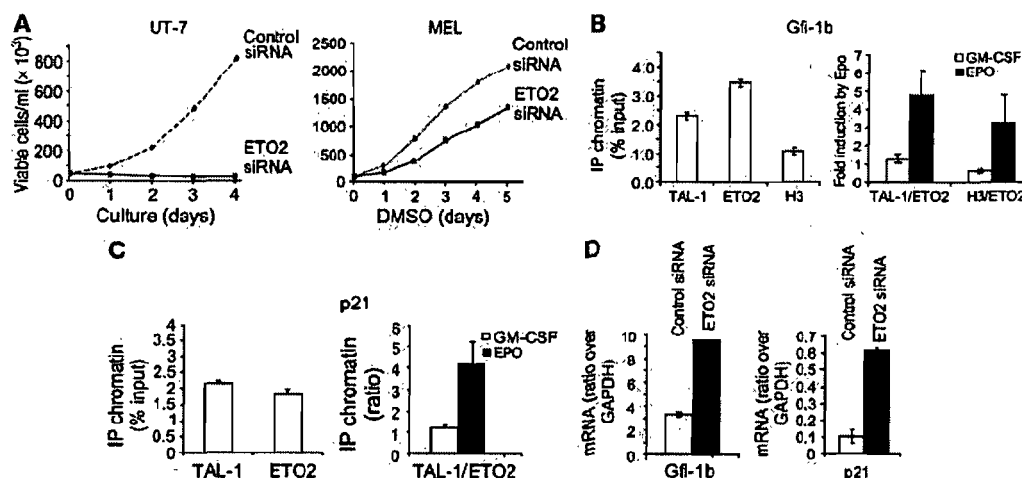


Figure 2-6. Gfi-1b and p21 are direct targets of the TAL-1/ETO2 complex during erythroid differentiation.

(A) ETO2 knockdown with human or mouse ETO2 siRNA (thick line) abrogated the growth of UT-7 cells and decreased the growth of MEL cells compared to cells transduced with a control siRNA (dotted line). (B and C) TF-1 cells were grown in the presence of GM-CSF and chromatin extracts were subjected to immunoprecipitations with the indicated antibodies (IP) and species-matched control IgG. DNA from immunoprecipitated chromatin was subjected to PCR analysis to detect the presence of Gfi-1b (B, left panel) or p21 (C, left panel) promoter sequences. Ratio changes in favor of activator (TAL-1 and acetylated histone H3) over repressor (ETO2) bound to the Gfi-1b (B, right panel) or p21 (C, right panel) promoters during Epo stimulation of TF-1 cells. All ChIP data are typical of two independent experiments. (D) Increased Gfi-1b and p21 mRNA in UT-7 cells one day after delivery of an ETO2 directed siRNA (black column) or a control siRNA (white column). Data shown are the average of three independent experiments and error bars denote S.D.

Primary CD34<sup>+</sup> cells isolated from umbilical cord blood undergo erythroid differentiation in a two step culture system characterized by a 5-day period of expansion of erythroid progenitors in the absence of Epo, monitored by the expression of the CD34 and CD36 surface markers, followed by a 4-day period of erythroid differentiation in the presence of Epo, monitored by the expression of the CD36 and GPA (Figure 2-7A) (Freyssinier et al., 1999). Similar to UT-7 cells, the delivery of ETO2 siRNA decreased by 4 fold the expansion of the CD34<sup>+</sup>CD36<sup>+</sup> population during the first phase and by 2-fold during the second phase of culture (Figure 2-7B and C). This was associated with a 2.5- and 8-fold increased Gfi-1b and p21 mRNA levels during the first phase, respectively, and two-fold increased p21 mRNA levels during the second phase of culture (Figure 2-7B and C). Despite decreased growth, ETO2 knockdown in primary human erythroid cells did not affect terminal erythroid differentiation (Figure 2-7D). Together, these data indicate that ETO2 is required for the expansion of erythroid progenitors but is dispensable for terminal maturation.

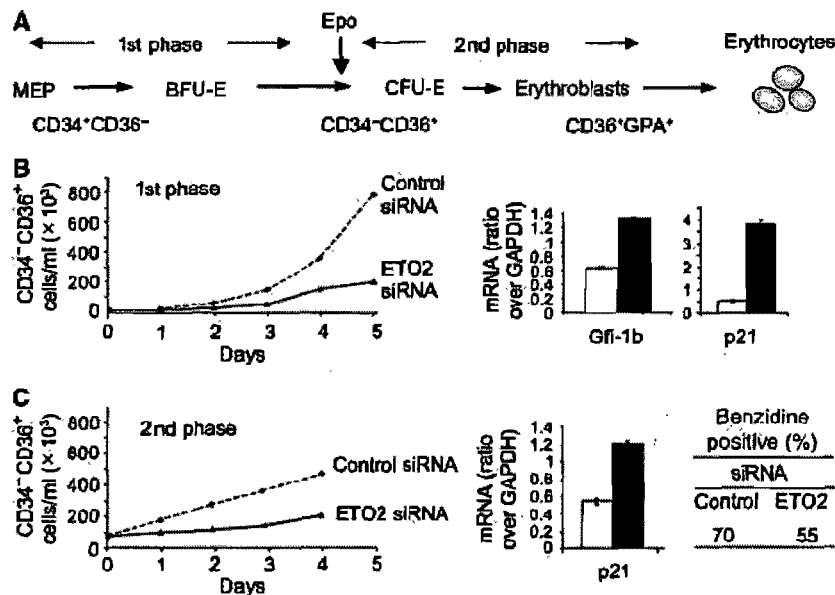


Figure 2-7. ETO2 regulates the proliferation of erythroid progenitors.

(A) Schematical representation of the different stages of erythroid differentiation (MEP, BFU-E, CFU-E and erythroblasts) and of CD34 and CD36 expression within the two-step culture system used. (B) Left panel: Cumulative growth curves of CD34<sup>+</sup>CD36<sup>+</sup> cells during the first phase of erythroid precursor amplification in the presence of an ETO2 (thick line) or a control siRNA (dotted line). Right panel: Gfi-1b and p21 mRNAs levels were quantified on day three of culture when the CD34<sup>+</sup>CD36<sup>+</sup> erythroid progenitors represent the main population. (C) Left panel: Cumulative growth curves of CD34<sup>+</sup>CD36<sup>+</sup> cells during the second phase of erythroid precursor amplification in the presence of an ETO2 (thick line) or a control siRNA (dotted line). Right panel: quantification of p21 mRNA level. Hemoglobinization of CD36<sup>+</sup> cells after 4 days of culture with Epo was monitored by benzidine staining. Data shown in (B) and (C) are the average of two independent experiments and error bars denote S.D.

## 2.5 Discussion

In the present study, we show a dual function for ETO2 in controlling erythroid lineage outcome, first by fine tuning the expression of TAL-1 target genes, and second, by controlling the expansion of erythroid progenitors. ETO2 seems to be recruited to TAL-1 containing complexes in undifferentiated CD34<sup>+</sup> cells via physical interaction with E2A and inhibits the transcriptional activity of the complexes. Furthermore, the balance of ETO2 versus TAL-1/HEB/E2A in the complex determines the onset and the magnitude of erythroid differentiation in uncommitted progenitors.

### 2.5.1 ETO2 acts as a repressor of TAL-1 target genes

The ETO protein is a translocation partner of the acute myeloid leukemia (AML)-1 transcription factor in human AML containing the t(8;21) translocation, resulting in expression of the AML-1-ETO fusion protein. The *eto* gene family consists of three members, ETO or MTG8, ETO2 or MTG16 (myeloid transforming gene chromosome 16) and MTGR1 (myeloid transforming gene-related protein-1) (Davis et al., 2003). This family is phylogenetically conserved and homologues are found in chicken (*cETO*) and *Drosophila* (*nervy*). The four nervy homology regions (NHR) are protein interaction motifs through which ETO and ETO2 can interact with HDAC family members (Gelmetti et al., 1998; Wang et al., 1998) and NcoR (Amann et al., 2001). Recently, ETO2 was shown to associate with E2A and HEB via its NHR1. This interaction precludes recruitment of p300/CREB-binding protein (CBP) coactivators by E2A/HEB, thus inactivating their transcriptional properties (Zhang et al., 2004). We show here that ETO2 represses the activity of the TAL-1 complex on erythroid genes and that the ratio of TAL-1 to ETO2 increases during erythroid differentiation, coinciding with the timing of transcription of TAL-1 target genes.

Consistent with the repressor function of ETO2, we found HDAC1 and HDAC2 associated with the TAL-1 complex in undifferentiated cells. On induction of MEL cell

differentiation, HDACs association decreased below the threshold of detection while TRRAP and BRD1 were recruited to the TAL-1 complex. TRAPP is an essential member of several chromatin modifying complexes with HAT activity (Herceg and Wang, 2005) and BRD1 is a bromodomain protein, a structure that has been implicated as an acetyl-lysine recognition module (Hassan et al., 2002). Thus, the exchange of ETO2-HDAC1/2 for TRRAP-BRD1 within the TAL-1 complex during differentiation potentially results in covalent modifications of histone tails that mark TAL-1 target loci for transcription. In support of this possibility, we found increased histone H3 acetylation at the GPA locus in cells undergoing erythroid differentiation, coinciding with increased GPA gene expression.

### **2.5.2 The dynamics and stoichiometry of the TAL-1 complex during erythroid differentiation**

The TAL-1 transcription factor can activate transcription if and only if all of the appropriate partners are recruited to target DNA sequences. This all-or-nothing behaviour that we refer to as coincidence detection allows for a tight control of gene expression (Lecuyer and Hoang, 2004). For example, obligatory TAL-1 partners include E2A or HEB bHLH transcription factors, LMO2, Ldb-1 and GATA-1 or GATA-2 (Cohen-Kaminsky et al., 1998; Lahilil et al., 2004; Lecuyer et al., 2002; Wadman et al., 1997). Through unbiased mass spectrometry analysis, we identify here these proteins as components of the core TAL-1 complex, in which TAL-1 acts as a nucleation platform (Lecuyer et al., 2002). In this complex, TAL-1 is limiting since elevating TAL-1 dosage in the cell increases GPA expression (Hoang et al., 1996) while E2A is not, as shown here for E12. Given that E2A is partitioned in TAL-1 and non TAL-1 complexes, these observations are not surprising. By these criteria, our functional studies suggest that ETO2 is limiting and therefore, is not able to sequester E2A from the TAL-1 complex. Consistent with this view, elevating ETO2 levels does not cause an imbalance of TAL-1 over E2A or HEB at the GPA locus. We therefore surmise that ETO2 represses the activity of the TAL-1 complex.

During differentiation the composition of transcription factor complexes varies through exchange of components (Lecuyer and Hoang, 2004), resulting in differential transcriptional output (Lahlil et al., 2004). Indeed, GATA-1 is recruited in late erythroblasts (MEL), while in erythroid progenitors (TF-1), GATA-2 recruitment is favored (Lahlil et al., 2004). We identify here another dynamic variation of the TAL-1 complex that does not involve partner substitution. We provide both biochemical and functional evidence that the stoichiometry of the ETO2 repressor with regards to the content of the TAL-1, E2A or HEB activators varies during the process of erythroid differentiation and that ETO2 levels determines the precise timing of expression of a set of erythroid-specific TAL-1 target genes. It will be important to address the mechanisms that govern this stoichiometry.

Our observations also suggest a biphasic imbalance in repressor to activator during differentiation. In undifferentiated cells, the TAL-1 complex associates with erythroid-specific regulatory regions such as the GPA promoter or the HS-26 of the murine  $\alpha$ -globin locus. This association might keep the chromatin in an open state but transcription is repressed by ETO2. Local fluctuations in the association of ETO2 with the TAL-1 complex within single cells could trigger intermittent and low levels of transcription at these loci and account for the low level of lineage gene expression in multipotential progenitors, a process known as lineage priming (Orkin, 2003). At the initiation of erythropoiesis, an elevation in TAL-1 and E2A or HEB levels changes the ratio of TAL-1 to ETO2 in favour of TAL-1, which offsets the inhibitory activity of ETO2 and triggers sustained expression of TAL-1 marked erythroid genes.

### **2.5.3 Cell differentiation versus cell proliferation: implications in leukemias**

Late erythroid progenitors (CFU-E), pro-erythroblasts and basophilic erythroblasts are the most actively cycling cells in the bone marrow (40-50%) (Gregory and Eaves, 1978; Iscove, 1977). Progression from the pro-erythroblast stage to the polychromatophilic erythroblast is associated with a sharp drop in cycling cells and an induction of p21



(Panzenbock et al., 1998). Thus, cell cycle arrest is intimately linked with terminal erythroid cell maturation suggesting that the two processes need to be co-ordinately regulated, but the underlying mechanism was not known. In the present study, we provide evidence that the dynamics of the TAL-1/ETO2 complex controls the expression of two essential regulators of erythroid proliferation, Gfi-1b and p21, during terminal erythroid differentiation, as well as the expression of a subset of erythroid genes. Furthermore, ETO2 is required for the expansion of erythroid progenitors, but dispensable for terminal differentiation. Together, our observations are consistent with the view that growth cessation occurs when ETO2 is decreased in erythroid progenitors, concomitant with the expression of TAL1 target genes, thereby pushing the cells towards terminal differentiation.

We therefore propose that the stoichiometry of ETO2 within the TAL1 complex controls the transitional process from expansion to terminal differentiation, which may be viewed as an important checkpoint in normal development. Indeed, cell proliferation and differentiation are uncoupled in leukemias. It is possible that variants of the ETO2-TAL-1 complex control this critical transitional process in other lineages. Consistent with this hypothesis, the genes encoding several members of the ETO2-TAL-1 complex are rearranged or mutated in acute leukemias: ETO2 in t(16;21) AML, TAL-1/SCL and LMO2 in T-ALL, E2A in pre-B-ALL and GATA-1 in acute megakaryoblastic leukemias of Down's syndrome.

## **2.6 Materials and Methods**

### **Cell culture and erythropoietin induction**

NIH 3T3, TF-1, UT-7 and MEL cells were cultured and stimulated to differentiate as described previously (Hoang et al., 1996; Lahlil et al., 2004). Human CD34<sup>+</sup> cells were purified and differentiated as described (Freyssinier et al., 1999; Ravet et al., 2004).

### **Purification of TAL-containing complexes**

The tagged full length TAL-1 construct was obtained by the fusion of the tal-1 cDNA to the BirA target peptide cDNA. BirA/EGFP fusion cDNA was obtained by the fusion of the two cDNAs. Both constructs were inserted in the TRIP- $\Delta$ U3-EF1 $\alpha$  lentivirus vector and lentiviruses were produced and used to transduce MEL cells. Nuclear extract preparation, streptavidin binding and mass spectrometry were performed as described (de Boer et al., 2003). All acquired product ion mass spectra were searched against a NCBI nr protein database using Mascot software (Matrix Science) and all potential matches were manually inspected.

### **Immunoprecipitations and immunoblot analysis**

Nuclear extracts from the indicated cells were pre-cleared for 30 minutes at 4°C using Protein G sepharose beads in lysis buffer (150 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol and 0.3% NP 40) containing protease inhibitors. Immunoprecipitations were performed in lysis buffer overnight at 4°C using antibodies against E2A, ETO2 (both from Santa Cruz) or TAL-1. Beads were washed six times with the lysis buffer at 4°C and bound material was eluted by boiling at 95°C in 1x Laemmli buffer. Immunoblot analysis was performed as described (Leroy-Viard et al., 1995).

### **Binding of transcription factors on immobilized promoters and transient transactivation assays**

The -84 GPA promoter fragments, wild type and the mutant for GATA sites and E box (Lahlil et al., 2004), were biotinylated and subsequently immobilized on streptavidin coated magnetic beads (Dynabeads M-280). Nuclear extracts from TF-1 cells, with or without Epo treatment, were incubated with immobilized -84 GPA promoters in binding buffer (20 mM Tris [pH 8.0], 10% glycerol, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.01% NP-40, 10 µg/ul polydI-dC) in a final concentration of 100 mM. The binding reactions were incubated with rotation for 60 min at 30°C and washed twice with 0.3 ml of binding buffer. The proteins bound to the immobilized templates were recovered following a 5 minutes boiling step in SDS-PAGE sample buffer. Proteins were then resolved on SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes for Western blot analysis. Band intensities were analysed with the Multigauge program (Fuji).

Transactivation assays were performed in triplicates essentially as previously described (Lecuyer et al., 2002). Mouse ETO2 complete coding sequence was cloned into pCDNA3.1 vector.

### **Chromatin immunoprecipitation**

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed essentially as described previously (Lecuyer et al., 2002; Tremblay et al., 2003), using TF-1 cells.

For real-time quantitative PCR analysis of the immunoprecipitated chromatin, we used Sybergreen detection kits (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and the Stratagene Mx4000 apparatus (Stratagene). Primer sequences used for specific promoter amplification are available upon request. A region of inactive chromatin was amplified as a negative control (ckit +13 532) as previously described (Lecuyer et al., 2002). Threshold cycles (Ct) were determined as recommended by the manufacturer's software for a dilution of input chromatin extracts and for each immunoprecipitated chromatin extract. The

occupancy of region X by protein p relative to input chromatin was obtained as described:  $p(X) = 2^{[Ct(IP) - Ct(input)]}$  (Geisberg and Struhl, 2004). Data are shown as fold enrichments over the values obtained for species-matched control Ig and the negative c-kit control region.

### **Viral vectors and cell transduction**

For siRNA production, siDNAs were cloned downstream of the H1 promoter in a lentivirus vector that also can express the EGFP cDNA. For human ETO2 overexpression, the ETO2 coding sequence was cloned into the pTRIPΔU3-EF1α vector plasmid. Lentiviral vector supernatants were produced as described (Amsellem et al., 2002) and used for infections. Retroviruses encoding ETO2, or their MSCV control were produced by transfection of the 293 VSV-G retroviral packaging cell line (Ory et al., 1996) and used for infections.

### **Flow cytometry**

Fetal liver cells from embryonic day 12.5 were harvested and cultured overnight in the presence of retroviruses expressing either ETO2-GFP or the MSCV-GFP control vector. Cells were stained with PE-Cy7-Ter119 antibodies and with 1μg of propidium iodide to exclude dead cells and analyzed by flow cytometry with the LSR II (Becton-Dickinson). Erythroid precursors were purified as described previously (Socolovsky et al., 2001) using the FACS Aria (Becton Dickinson)

### **RT-PCR**

Preparation of cDNA and specific PCR amplifications were performed as previously described (Herblot et al., 2000). Oligonucleotide sequences are available upon request. PCR products were revealed with internal oligonucleotide probes and hybridization signals quantified through exposure to a PhosphorImager screen (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences). For real-time quantitative PCR, we used Sybergreen detection kits (Qiagen)

according to the manufacturer's instructions and the Stratagene Mx4000 apparatus (Stratagene).

## **2.7 Acknowledgments**

We thank Drs Daniele Mathieu and Catherine Porcher for human or mouse TAL-1 antibodies, Dr. Jeroen Krijgsveld for mass spectrometry analysis, B.Izac for help in the preparation of the lentiviruses, R. Lahlil for help with the VSV, M.A.Vinit, A. Haman and A. Perreault for technical help, and Daniele Gagné for cell sorting. We thank all our colleagues for thoughtful discussions. N.G. was supported by studentships from the ARC and the French Hematology Society and J.A.L. studentships from the National Science and Engineering Research Council, the Fonds de Recherche en Santé du Québec and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). This work was supported by grants from INSERM, CNRS, ARC, the Ligue Nationale contre le Cancer, CIHR, the Cancer Research Society Inc. and the National Cancer Institute of Canada.

## 2.8 References

- Amann,J.M., Nip,J., Strom,D.K., Lutterbach,B., Harada,H., Lenny,N., Downing,J.R., Meyers,S., and Hiebert,S.W. (2001). ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. *Mol. Cell Biol.* 21, 6470-6483.
- Amsellem,S., Ravet,E., Fichelson,S., Pflumio,F., and Dubart-Kupperschmitt,A. (2002). Maximal lentivirus-mediated gene transfer and sustained transgene expression in human hematopoietic primitive cells and their progeny. *Mol. Ther.* 6, 673-677.
- Anguita,E., Hughes,J., Heyworth,C., Blobel,G.A., Wood,W.G., and Higgs,D.R. (2004). Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *EMBO J.* 23, 2841-2852.
- Asari,S., Sakamoto,A., Okada,S., Ohkubo,Y., Arima,M., Hatano,M., Kuroda,Y., and Tokuhisa,T. (2005). Abnormal erythroid differentiation in neonatal bcl-6-deficient mice. *Exp. Hematol.* 33, 26-34.
- Begley,C.G. and Green,A.R. (1999). The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood* 93, 2760-2770.
- Bottardi,S., Aumont,A., Grosveld,F., and Milot,E. (2003). Developmental stage-specific epigenetic control of human beta-globin gene expression is potentiated in hematopoietic progenitor cells prior to their transcriptional activation. *Blood* 102, 3989-3997.
- Cantor,A.B. and Orkin,S.H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 21, 3368-3376.

Cohen-Kaminsky,S., Maouche-Chretien,L., Vitelli,L., Vinit,M.A., Blanchard,I., Yamamoto,M., Peschle,C., and Romeo,P.H. (1998). Chromatin immunoselection defines a TAL-1 target gene. *EMBO J.* *17*, 5151-5160.

Davis,J.N., McGhee,L., and Meyers,S. (2003). The ETO (MTG8) gene family. *Gene* *303*, 1-10.

de Boer,E., Rodriguez,P., Bonte,E., Krijgsveld,J., Katsantoni,E., Heck,A., Grosveld,F., and Strouboulis,J. (2003). Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 7480-7485.

Freyssinier,J.M., Lecoq-Lafon,C., Amsellem,S., Picard,F., Ducrocq,R., Mayeux,P., Lacombe,C., and Fichelson,S. (1999). Purification, amplification and characterization of a population of human erythroid progenitors. *Br. J. Haematol.* *106*, 912-922.

Garcon,L., Lacout,C., Svinartchouk,F., Le Couedic,J.P., Villeval,J.L., Vainchenker,W., and Dumenil,D. (2005). Gfi-1B plays a critical role in terminal differentiation of normal and transformed erythroid progenitor cells. *Blood* *105*, 1448-1455.

Geisberg,J.V. and Struhl,K. (2004). Quantitative sequential chromatin immunoprecipitation, a method for analyzing co-occupancy of proteins at genomic regions in vivo. *Nucleic Acids Res.* *32*, e151.

Gelmetti,V., Zhang,J., Fanelli,M., Minucci,S., Pelicci,P.G., and Lazar,M.A. (1998). Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. *Mol. Cell Biol.* *18*, 7185-7191.

Gregory,C.J. and Eaves,A.C. (1978). Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 51, 527-537.

Hall,M.A., Curtis,D.J., Metcalf,D., Elefanty,A.G., Sourris,K., Robb,L., Gothert,J.R., Jane,S.M., and Begley,C.G. (2003). The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 992-997.

Hassan,A.H., Prochasson,P., Neely,K.E., Galasinski,S.C., Chandy,M., Carrozza,M.J., and Workman,J.L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111, 369-379.

Herblot,S., Steff,A.M., Hugo,P., Aplan,P.D., and Hoang,T. (2000). SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat. Immunol.* 1, 138-144.

Herceg,Z. and Wang,Z.Q. (2005). Rendez-vous at mitosis: TRRAPed in the chromatin. *Cell Cycle* 4, 383-387.

Hoang,T., Paradis,E., Brady,G., Billia,F., Nakahara,K., Iscove,N.N., and Kirsch,I.R. (1996). Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* 87, 102-111.

Huang,D.Y., Kuo,Y.Y., Lai,J.S., Suzuki,Y., Sugano,S., and Chang,Z.F. (2004). GATA-1 and NF-Y cooperate to mediate erythroid-specific transcription of Gfi-1B gene. *Nucleic Acids Res.* 32, 3935-3946.



Iscoe,N.N. (1977). The role of erythropoietin in regulation of population size and cell cycling of early and late erythroid precursors in mouse bone marrow. *Cell Tissue Kinet.* *10*, 323-334.

Lahlil,R., Lecuyer,E., Herblot,S., and Hoang,T. (2004). SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A expression. *Mol. Cell Biol.* *24*, 1439-1452.

Lecuyer,E., Herblot,S., Saint-Denis,M., Martin,R., Begley,C.G., Porcher,C., Orkin,S.H., and Hoang,T. (2002). The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* *100*, 2430-2440.

Lecuyer,E. and Hoang,T. (2004). SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp. Hematol.* *32*, 11-24.

Leroy-Viard,K., Vinit,M.A., Lecointe,N., Jouault,H., Hibner,U., Romeo,P.H., and Mathieu-Mahul,D. (1995). Loss of TAL-1 protein activity induces premature apoptosis of Jurkat leukemic T cells upon medium depletion. *EMBO J.* *14*, 2341-2349.

Melnick,A.M., Westendorf,J.J., Polinger,A., Carlile,G.W., Arai,S., Ball,H.J., Lutterbach,B., Hiebert,S.W., and Licht,J.D. (2000). The ETO protein disrupted in t(8;21)-associated acute myeloid leukemia is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol. Cell Biol.* *20*, 2075-2086.

Mikkola,H.K., Klintman,J., Yang,H., Hock,H., Schlaeger,T.M., Fujiwara,Y., and Orkin,S.H. (2003). Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* *421*, 547-551.

Orkin,S.H. (2003). Priming the hematopoietic pump. *Immunity.* *19*, 633-634.

Ory,D.S., Neugeboren,B.A., and Mulligan,R.C. (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 11400-11406.

Panzenbock,B., Bartunek,P., Mapara,M.Y., and Zenke,M. (1998). Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood* 92, 3658-3668.

Porcher,C., Liao,E.C., Fujiwara,Y., Zon,L.I., and Orkin,S.H. (1999). Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding. *Development* 126, 4603-4615.

Ravet,E., Reynaud,D., Titeux,M., Izac,B., Fichelson,S., Romeo,P.H., Dubart-Kupperschmitt,A., and Pflumio,F. (2004). Characterization of DNA-binding-dependent and -independent functions of SCL/TAL1 during human erythropoiesis. *Blood* 103, 3326-3335.

Reinke,H. and Horz,W. (2003). Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol. Cell* 11, 1599-1607.

Robb,L., Elwood,N.J., Elefanty,A.G., Kontgen,F., Li,R., Barnett,L.D., and Begley,C.G. (1996). The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J.* 15, 4123-4129.

Saleque,S., Cameron,S., and Orkin,S.H. (2002). The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes Dev.* 16, 301-306.

Shivdasani,R.A., Mayer,E.L., and Orkin,S.H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373, 432-434.

Smale,S.T. (2003). The establishment and maintenance of lymphocyte identity through gene silencing. *Nat. Immunol.* 4, 607-615.

Socolovsky,M., Nam,H., Fleming,M.D., Haase,V.H., Brugnara,C., and Lodish,H.F. (2001). Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* 98, 3261-3273.

Torigoi,E., nani-Baiti,I.M., Rosen,C., Gonzalez,K., Morcillo,P., Ptashne,M., and Dorsett,D. (2000). Chip interacts with diverse homeodomain proteins and potentiates bicoid activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 2686-2691.

Tremblay,M., Herblot,S., Lecuyer,E., and Hoang,T. (2003). Regulation of pT alpha gene expression by a dosage of E2A, HEB, and SCL. *J. Biol. Chem.* 278, 12680-12687.

Wadman,I.A., Osada,H., Grutz,G.G., Agulnick,A.D., Westphal,H., Forster,A., and Rabbitts,T.H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* 16, 3145-3157.

Wang,J., Hoshino,T., Redner,R.L., Kajigaya,S., and Liu,J.M. (1998). ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 10860-10865.

Xu,Z., Huang,S., Chang,L.S., Agulnick,A.D., and Brandt,S.J. (2003). Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation. *Mol. Cell Biol.* 23, 7585-7599.

Zhang,J., Kalkum,M., Yamamura,S., Chait,B.T., and Roeder,R.G. (2004). E protein silencing by the leukemogenic AML1-ETO fusion protein. *Science* 305, 1286-1289.

## 2.9 Supplementary data

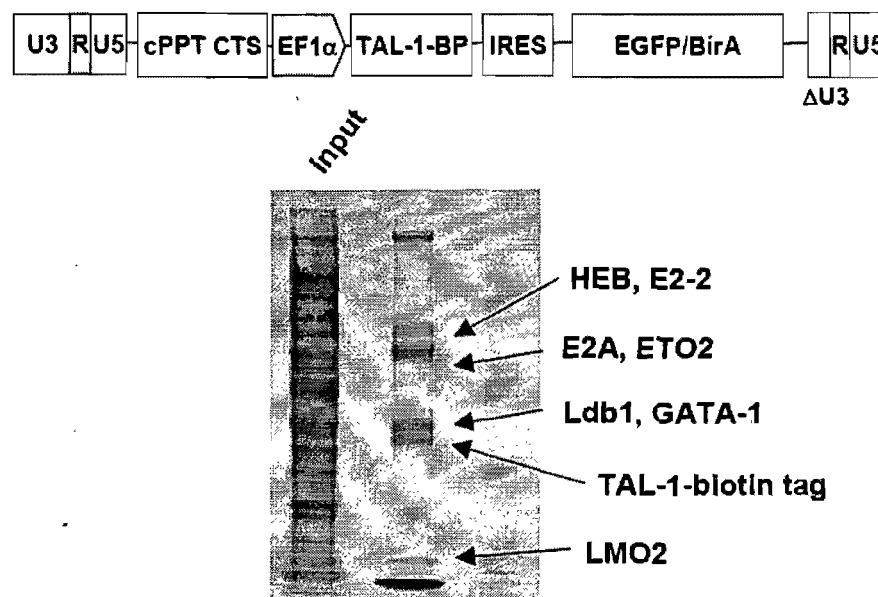


Figure S 2-1. ETO2 is associated with TAL-1 in MEL cell nuclear extracts.

Representation of the virus used to produce the biotinylated TAL-1 protein and migration of various TAL-1 partners on an SDS-PAGE gel after streptavidin pull-down of nuclear extracts from MEL cells expressing the TAL-1-biotin tag protein. Nuclear extracts before streptavidin pull-down is also shown (Input). Arrows point to the position of some of the transcription factors identified by mass spectrometry.

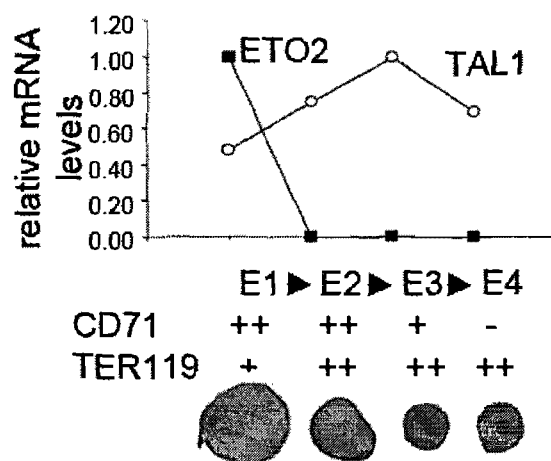
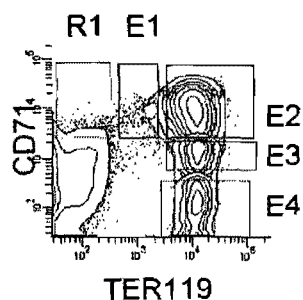
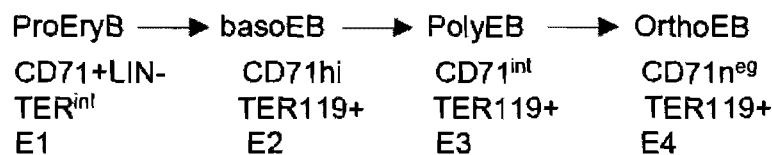


Figure S 2-2.

Primary hematopoietic cells from mouse bone marrow were purified by flow cytometry as depicted. CFU-Es are highly enriched in the LIN-CD71<sup>+</sup> fraction. The TER119<sup>+</sup> fraction contained pro-erythroblasts (E1), basophilic erythroblasts (E2), polychromatophilic erythroblasts (E3) and orthochromatophilic erythroblasts (E4). ETO2 and TAL-1 mRNA levels were quantified in the E1, E2, E3 and E4 cell populations by real-time PCR.

Days of culture	0	1	2	3	4	5
MEL control siRNA	0	0,5	1,1	3,1	5,1	8,3
MEL ETO2 siRNA	0	0,6	1,2	3	5,3	8,2

Days of culture	0	1	2	3	4
UT-7 control siRNA	0	1,8	2,9	5	8
UT-7 ETO2 siRNA	0	2	3	5,2	8,5

Figure S 2-3

The percentage of apoptotic cells during DMSO-induced differentiation of MEL cells or Epo-dependent growth of UT-7 cells was determined daily using Annexin V and flow-cytometry analysis.

### **3 ETO2 prevents multi-lineage differentiation and promotes self-renewal in HSC**



**ETO2 PREVENTS MULTI-LINEAGE DIFFERENTIATION AND PROMOTES SELF-RENEWAL IN HSC**

Julie A. Lambert, Julie Lacombe, Sabine Herblot, Stéphane Barakat, Guy Sauvageau, and  
Trang Hoang.

Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie, Montréal, Canada.

Article pour soumission dans Genes and Development

### **3.1 Contribution des co-auteurs**

J.A.L: Design expérimental, réalisation des expériences et analyse de toutes les données, rédaction du manuscrit.

J.L: Transplantations des souris et analyse des souris primaires.

S.H : Transplantation des souris, discussion et analyses des résultats.

S.B: RT-PCR (Figure 3-1).

G.S : Design expérimental et discussion.

T.H : Design expérimental, analyses et rédaction du manuscrit.

### 3.2 Abstract

Hematopoietic stem cells (HSC) undergo self-renewal in vivo whereas HSCs that are taken out of their niche decline in culture. The *Eto2* gene was identified as a translocation partner for AML1. ETO2 is a transcriptional co-repressor that associates with E2A and the SCL complex and governs the transition between a proliferative state and commitment to differentiation in erythroid progenitors. We now provide evidence that ETO2 is also implicated in the control of hematopoietic stem cell fate. ETO2 overexpression inhibits differentiation and bypasses the need for environmental cues, resulting in a 100 fold expansion of HSC in vitro compared to control cells. ETO2 precludes HSC differentiation at an early stage and inhibits the generation of hematopoietic progenitors of all lineages, without affecting proliferation or apoptosis. Together, our observations support a role for ETO2 in HSC self-renewal possibly by preventing differentiation.

### 3.3 Introduction

Hematopoietic stem cells (HSC) sustain a life-long production of the full spectrum of mature blood cells. This is achieved through a balance of self-renewal divisions through which HSCs give rise to identical daughter cells and/or daughter cells committed to multi-lineage differentiation. The self-renewal function of HSC is determined by the integration of intrinsic and extrinsic signals, which are either positive signals promoting stem cell symmetrical division, and negative signals leading to quiescence, apoptosis or differentiation (reviewed in (Akala and Clarke, 2006)). Some of these signals have been identified but overall, mechanisms governing self-renewal in HSCs remain to be elucidated. Of note, HSCs that are taken out of their normal environment decline rapidly, even in the presence of an optimal combination of cytokines and growth factors. Among the few regulators of self-renewal identified so far, the transcription factor HOXB4 is clinically the most promising candidate for several reasons. Ectopic HOXB4 expression induces a net 2000-fold expansion of HSC numbers in vivo (Sauvageau et al., 1995; Thorsteinsdottir et al., 1999) and 40-fold ex vivo (Antonchuk et al., 2002). Furthermore, this expansion is observed at the HSC level without affecting the production of differentiated cells in vivo.

Recently, we and others identified the ETO2 transcriptional co-repressor as an inhibitor of erythroid lineage development (Goardon et al., 2006; Schuh et al., 2005). We have shown that ETO2 represses the maturation of erythroid progenitors, while promoting their proliferation. Furthermore, our observations indicate that the stoichiometry of ETO2 to the SCL transcriptional activator coordinates growth cessation with terminal erythroid differentiation (Goardon et al., 2006). ETO proteins are known to act as an interface between DNA-binding transcription factors (hereby, SCL) and chromatin modifying enzymes associated with repressive function, like HDAC and N-CoR (Rossetti et al., 2004; Schuh et al., 2005; Goardon et al., 2006). Indeed, our proteomic analyses of the SCL complex indicate that the transition between an ‘undifferentiated’ and a differentiating state

in erythroid progenitors is associated with an epigenetic switch involving HDAC and HAT proteins. The recruitment of ETO2 to transcriptional complexes maintains chromatin in a repressive state, which can be alleviated upon ETO2 release or diminished occupancy on promoter. Interestingly, the human ETO2 homologue, MTG16, is highly expressed in undifferentiated cells (CD34<sup>+</sup> or LIN<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>) and down-regulated upon differentiation, while its expression in total bone marrow cells is almost undetectable (Lindberg et al., 2005; Okumura et al., 2007), supporting a role for ETO2 in HSC biology. Accordingly, the ETO2 knockdown in zebra fish revealed a complete absence of definitive hematopoiesis (Meier et al., 2006). Significantly, leukemia is always associated with an uncoupling between proliferation and differentiation (Tenen, 2003). Moreover, ETO2 was originally identified as a AML1 translocation partner [t(16;21)] in human therapy related AML, strengthening the view that ETO2 is a critical regulator of hematopoiesis and that aberrant expression of ETO2 impairs the balance of proliferation and differentiation, not only in the erythroid compartment, but possibly at the HSC level.

In view of ETO2 expression in undifferentiated cells, the implication of ETO2 (MTG16) in human AML, the requirement of ETO2 for definitive hematopoiesis, and the role of ETO2 in governing the switch between proliferation and differentiation in the erythroid lineage, we have addressed ETO2 functions in HSC. By overexpressing ETO2 in fetal liver and bone marrow cells to perform *in vivo* and *ex vivo* functional assays, we provide evidence that ETO2 promotes extensive HSC self-renewal, mainly by preventing early HSC differentiation. Our results support a new role for ETO2 in the coordination of HSC differentiation and self-renewal and bring forward a new mechanism controlling self-renewal by modulating chromatin accessibility.

## 3.4 Results

### 3.4.1 ETO2 is expressed in HSC-enriched population and down-regulated in early myeloid progenitors

An enrichment of ETO2 mRNA in human CD34<sup>+</sup> immature cells was reported (Lindberg et al., 2005). To gain insight into the role of ETO2/MTG16 in HSC and hematopoietic progenitors, we first examined ETO2 expression by quantitative real-time PCR in purified populations. Hematopoietic stem cells include short-term (ST) as well as long-term (LT) repopulating cells and both are found within the KSL (Kit<sup>+</sup>, Sca<sup>+</sup>, LIN<sup>-</sup>) population. Recent studies revealed that LT-HSC also express distinctive adhesion markers (CD150<sup>+</sup>CD48<sup>+</sup>) (SLAM), not found in ST-HSC (Kiel et al., 2005). We also analysed early lymphoid (CLP) and myeloid progenitors (CMP), granuloid and megakaryo-erythroid progenitor (GMP and MEP) (Kondo et al., 1997). As shown in Figure 3-1, *Eto2* expression levels are highest in populations that are enriched in HSC (KSL) and CLP. Low *Eto2* levels in the SLAM-KSL population (LT-HSC) suggest that elevated *Eto2* expression within the KSL population comes from ST-HSC, a rapidly expanding population with multi-lineage potential. In contrast, *Eto2* expression decreases in all other progenitors (CMP, GMP, MEP). This differential pattern of expression suggests a role for ETO2 in HSC regulation.

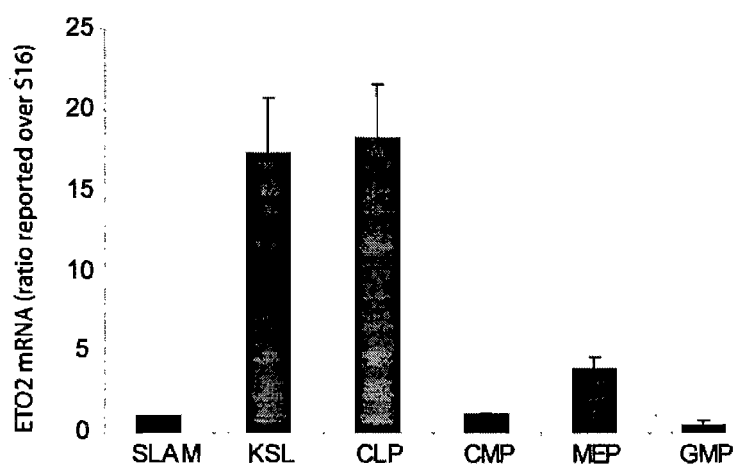


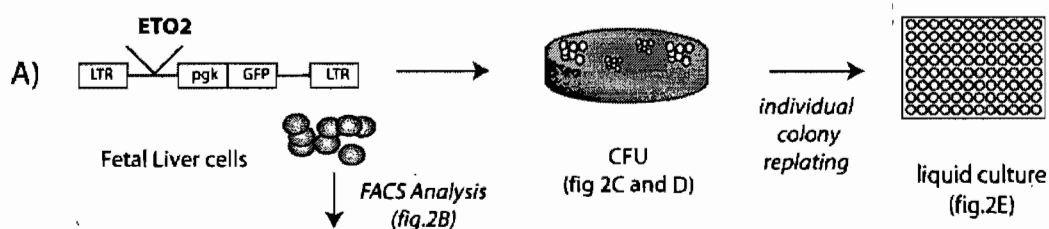
Figure 3-1 *Eto2* expression in HSC and progenitor populations.

Bone marrow cells were purified by flow cytometry to enrich for long-term (SLAM) and short-term (KSL) HSCs, and lineage progenitors (CLP, CMP, MEP and GMP). *Eto2* expression determined by q-PCR is high in HSCs and significantly down regulated in lineage progenitors except in CLP.

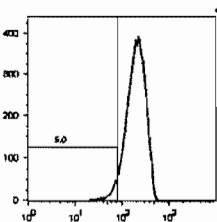
### **3.4.2 ETO2 promotes in vitro expansion of fetal liver HSC**

To directly address the role of ETO2 in HSCs, we overexpressed ETO2 in fetal liver cells (E13.5) with the MSCV retroviral vector containing ETO2-GFP or GFP alone, and analysed cells by flow cytometry and in culture (Figure 3-2A). Strikingly, the overexpression of ETO2 generates a major shift of lineage positive cells toward lineage negative cells (Fig.2B, left panel). Among the lineage negative cells, 69.5% are also positive for progenitor and stem cell markers (c-Kit and Sca-1) (Figure 3-2B, right panel), indicating that ETO2 specifically expands the KSL population while decreasing the mature Lin<sup>+</sup> population. We then performed colony assays to evaluate their capacity to proliferate in culture (Figure 3-2C). In contrast to the increased frequency of the KSL population in ETO2 transduced cells, there is no significant difference in CFU numbers between ETO2 and control cultures. However, in ETO2-transduced cells, we noticed the formation of large undifferentiated colonies referred to as High Proliferative Potential colonies (HPP-CFU) (Figure 3-2C and D). HPP-CFUs have been correlated with cells capable of repopulating the bone marrow of lethally irradiated mice (McNiece et al., 1990). To confirm that these colonies were indeed HPP-CFU, colonies were replated individually to assess their growth curves in liquid culture (Figure 3-2E). Control cells decline within 3 days of culture. In contrast ETO2-cells continue to grow extensively in culture, confirming their high proliferative potential. Together, these results indicate that ETO2 expands an immature population that has a high proliferative potential, but is deficient in producing differentiated cells, consistent with the reported role of ETO2 in blocking erythroid differentiation (Goardon et al., 2006).

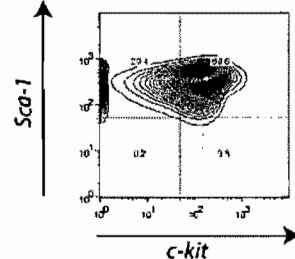
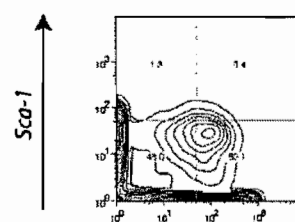
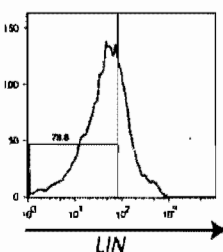




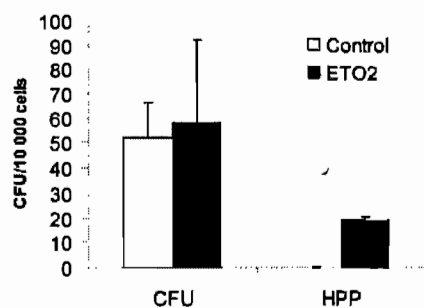
**B)** GFP transduced-cells



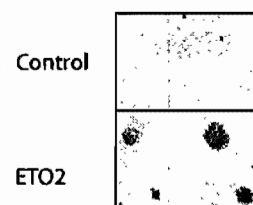
ETO2 transduced-cells



**C)** CFU and HPP in fetal liver cells



**D)**



**E)**

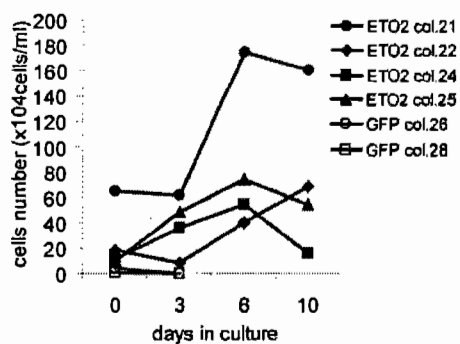


Figure 3-2. ETO2 overexpression in fetal liver cells expands the KSL population and progenitors with high proliferative potential at the expense of differentiated cells.

A) E13.5 fetal liver cells were transduced with ETO2-GFP or GFP alone as a control. Two days following gene transfer, cells were analysed by flow cytometry or plated in methylcellulose culture for 10 days. Individual colonies were then picked and individually transferred in 96-well liquid culture. B) Cells were analysed by flow cytometry following gene transfer. ETO2-expressing cells are highly enriched in lineage negative and KSL cells compared to control cells expressing the GFP vector alone. Data are shown for GFP<sup>+</sup> cells and are representative of two independent experiments. C) CFUs (excluding HPP) were scored at day 10 of methylcellulose culture. D) HPP colonies are observed in ETO2 cells only, as seen on a contrast phase microscope (30X). E) Individual HPP colonies were transferred in liquid culture for 10 days. Every 3 days, cells were counted and reseeded at  $1 \times 10^6$  cells/ml.

### **3.4.3 ETO2 represses multi-lineage differentiation and expands primitive populations**

To further define ETO2 function in HSC population, we transduced bone marrow cells with ETO2 and analysed the cells by flow cytometry and by transplantation in limiting dilution assays (Figure 3-3A). The cells were either transplanted immediately after gene delivery (referred thereafter as d0 transplantation) or after 7 days of culture (d7 transplantation) to assess their ex vivo potential. Furthermore, cells recovered from primary hosts were retransplanted into secondary hosts. In addition to ETO2 and control GFP, we included HOXB4 as a control for HSC expansion (Sauvageau et al., 1995; Thorsteinsdottir et al., 1999; Antonchuk et al., 2001; Antonchuk et al., 2002).

ETO2 transduction resulted in high ETO2 protein levels in GFP-positive cells as compared to cells transduced with an empty vector control (Figure 3-3B). We next analysed cell surface markers by flow cytometry, immediately after infection (d0) or 7 days after culture (d7), using lineage markers (LIN: CD3, B220, Ter110, Gr-1, and CD11b), and stem cells markers (c-kit and Sca-1). As shown in Figure 3-4A, the KSL population within the control GFP positive population was barely maintained under these culture conditions which are suboptimal for HSC growth (Fraser et al., 1992; Ema et al., 2000; Uchida et al., 2003). In contrast, ETO2 induces a 13.5 fold enrichment of the KSL population (GFP positive), suggesting the role of ETO2 in promoting expansion of the KSL population under sub-optimal conditions. Similarly, HOXB4 induces an expansion of KSL cells as well (10.8X). We then performed progenitor assay (CFU) and found that their frequencies was not increased by HOXB4 expression, as expected (Figure 3-4B). Indeed, CFU assays measure progenitors function, more than HSC's. In contrast, CFU were severely impaired by ETO2 expression. Thus, despite the expansion of the KSL population which is enriched in HSC, committed progenitors as defined in colony assays were inhibited by ETO2, consistent with data observed using fetal liver cells. These observations suggest a differentiation defect at early stages.

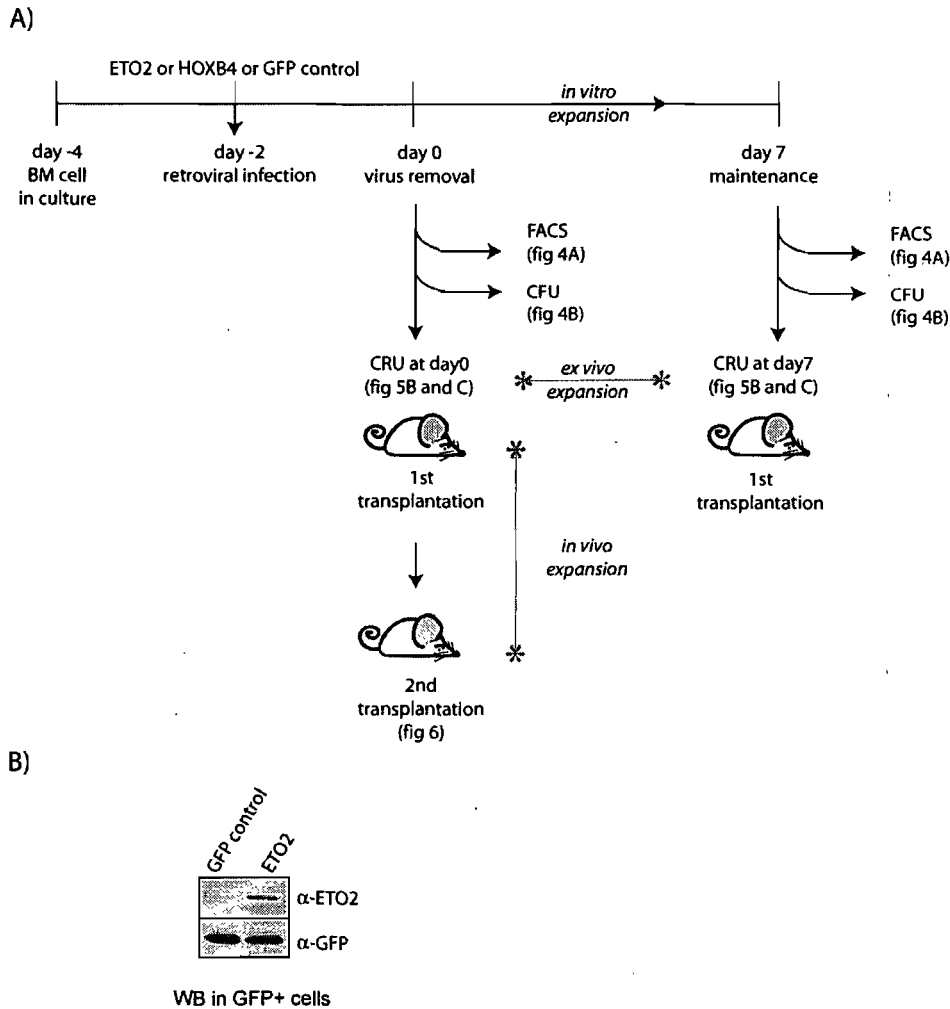


Figure 3-3. ETO2 overexpression in mouse bone marrow cells.

A) Experimental outlines to assess ETO2 function in HSCs. Ly5.1 bone marrow cells were transduced with ETO2, HOXB4 or empty MSCV-GFP vector (mock) as a control. The green fluorescent protein (GFP) was co-expressed as a marker to isolate and track transduced cells. Transduced cells are either immediately transplanted in Ly5.2 mice for limiting dilution analysis (CRU) on day 0 or kept in culture for 7 days prior to limiting dilution analysis to determine HSC frequency. HSC ex vivo expansion was calculated as the ratio of CRU on d7 over that of d0. HSC in vivo expansion was assessed by transplanting bone marrow cells that were recovered from mice transplanted on d0. B) ETO2 protein is expressed in ETO2-GFP positive cells compared to GFP control cells. Spleen cells from the mice transplanted with control cells or ETO2-cells (CD45.1<sup>+</sup>) were sorted for GFP expression and analysed for protein expression by western blotting.

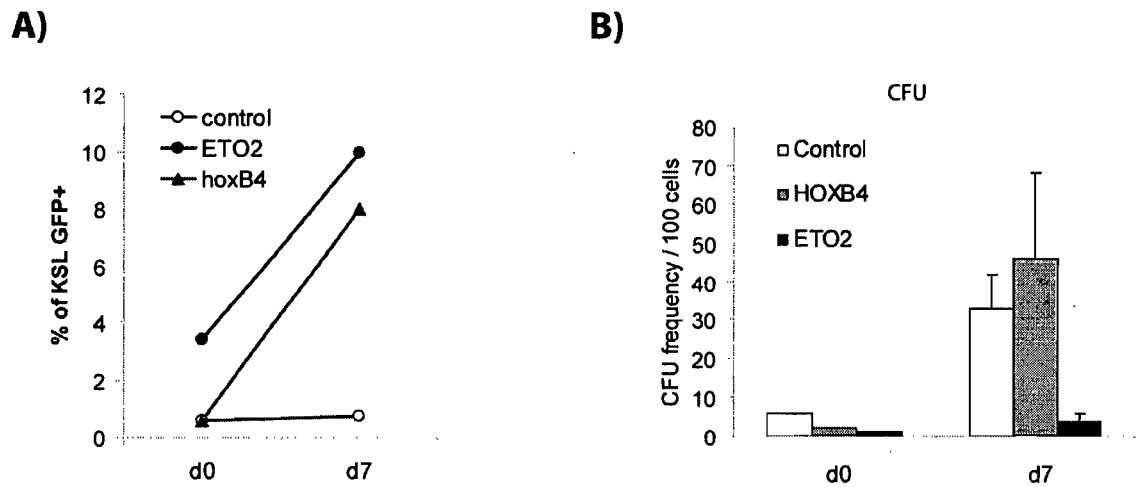


Figure 3-4. ETO2 specifically expands the HSC (KSL) pool without affecting progenitors (CFU) in vitro.

A) ETO2 promotes HSC (KSL) expansion in culture, whereas the percentage of KSL in control cultures remains constant. The expansion induced by ETO2 is comparable to that supported by HoxB4. Data shown are representative of at least two independent experiments. B) CFU frequency for ETO2, HOXB4 or control transduced cells at day 0 and 7. In parallel to transplantation studies, transduced cells were plated either on day 0 or day 7 in methylcellulose cultures to determine the frequency of all hematopoietic progenitors (CFU). Colonies were scored 9 days after culture.

Transduced cells were therefore transplanted and long term reconstitution was analysed in the peripheral blood and bone marrow. The GFP<sup>+</sup> fraction from ETO2 mice were enriched for Sca-1 expression, a marker for progenitor cells (Figure 3-5A). To address whether the expansion observed in vitro for the KSL population correlates with an expansion of LT-HSC, we calculated CRU frequency based on reconstitution within the KSL population. Interestingly, this analysis revealed that ETO2 has a minimal effect on HSC on day 0 (1.6 fold increase over control MSCV) while inducing a dramatic 100 fold increase compared to control cells after 7 days in culture (Figure 3-5B). An ex vivo

expansion of this magnitude has only been reported for HOXB4 and supports a role for ETO2 in HSC maintenance or self-renewal. This activity of ETO2 is uniquely evident in vitro, i.e. under conditions that are suboptimal for HSC self-renewal. To assess whether ETO2 impedes differentiation in vivo, we analysed the percentage of GFP positive cells for all lineages in the peripheral blood twelve weeks following transplantation. As shown in Figure 3-5C, high reconstitution was observed with control cells prior to culture (d0) but not after culture (d7). In contrast, very few GFP positive cells were found either on d0 or d7 for ETO2 expressing cells, whereas HOXB4 confers higher repopulation activity than control on d7, as expected. These results indicate that ETO2 impedes multilineage differentiation in HSCs. Furthermore, ETO2 overexpression did not affect HSC numbers in vivo (d0), consistent with its low level expression in these cells. However, ETO2 expands HSC in vitro (d7) whereas control HSCs normally decline. These observations suggest that ectopic ETO2 expression bypasses the need for environmental cues to sustain HSCs outside of their niche.

We next assessed whether GFP expression correlates with the presence of ETO2 cDNA in each lineage (Figure 3-5D). ETO2 integration was found in total bone marrow as well as in purified GFP<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>, /B220<sup>+</sup> and /CD3<sup>+</sup> cells but not in GFP<sup>-</sup> cells. Of note, ETO2 DNA integration was not detected in erythroid (Ter119<sup>+</sup>) and granulocytic/monocytic (CD11b<sup>+</sup>) cells. Thus, the few GFP<sup>+</sup> that we were able to detect in these lineages lacked ETO2, suggesting a selection for non ETO2 expressing cells in granulo-monocytic and erythroid cells. Taken together, our results indicate that ETO2 expands the HSC population and inhibits differentiation in all lineages, although B and T cells are less affected than myeloid and erythroid cells. Thereby, the low proportion of ETO2 transduced cells in the peripheral blood (Figure 3-5C) and the low CFU counts (Figure 3-4B) are likely direct consequences of a differentiation blockade. These analyses, performed 8 months after transplantation, indicate that the GFP<sup>+</sup> KSL population analysed in these mice derived from long-term repopulating stem cells (LT-HSC). We propose that ETO2 has expanded LT-HSC ex vivo by promoting self-renewal, and that these cells are unable to progress through differentiation.



Figure 3-5. ETO2 overexpression in bone marrow cells blocks differentiation and promotes HSC expansion in transplantation assays.

A) Bone marrow cells from mice transplanted with ETO2 or control (empty vector) cells as depicted in figure 3-3A were analysed by flow cytometry for lineage markers, c-Kit and Sca-1 expression. Shown are representative flow cytometry analyses of one mouse transplanted with ETO-2 expressing cells or control cells, within the LIN<sup>-</sup> population. B) ETO2 induces HSC expansion in vivo. Shown are CRU frequencies calculated on the basis of GFP<sup>+</sup> KSL recovered in the bone marrow of transplanted mice. C) ETO2 impedes blood reconstitution. Transplanted mice were analysed for reconstitution in the peripheral blood for the percentage of GFP<sup>+</sup> cells 12 weeks following transplantation on day 0 (left graph) and day 7 (right graph) in regard of injected cell doses: A (200,000 cells), B (50,000), C (10,000) and D (2,000); E (1/5 from 1,000,000 cells at d0 of cell culture), F(1/50), G (1/500), H (1/5,000) and I (1/50,000). D) ETO2 DNA integration in GFP<sup>+</sup> bone marrow cells. GFP<sup>+</sup> cells were sorted (10,000) and the presence of the ETO2 cDNA was determined by PCR amplification. E2F serves as a control for DNA extraction.



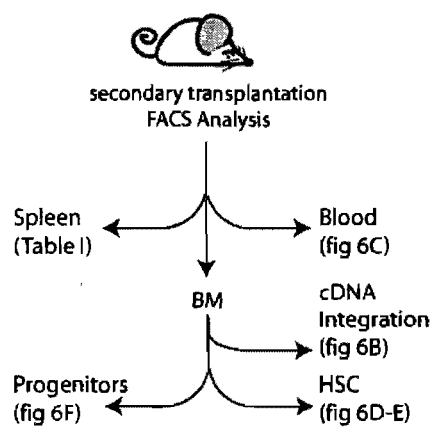
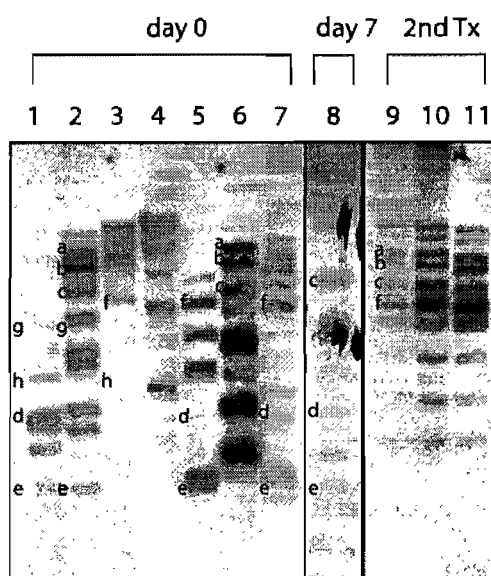
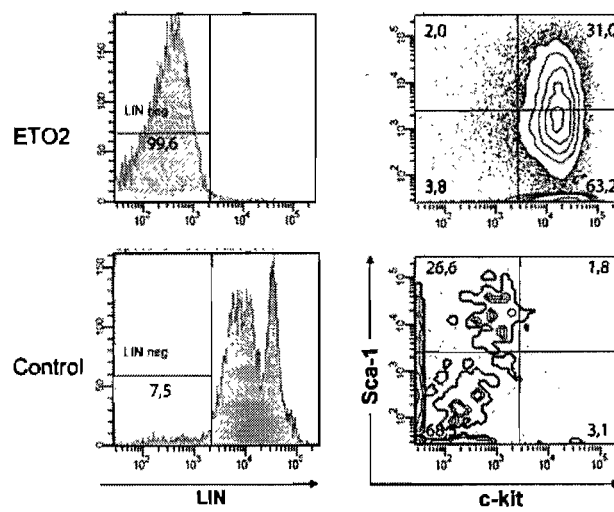
### 3.4.4 ETO2 influences HSC self-renewal and inhibits the generation of early progenitors

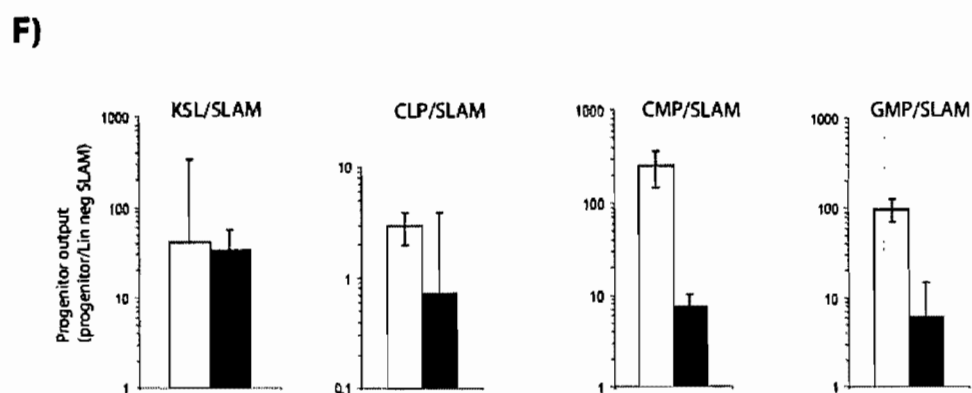
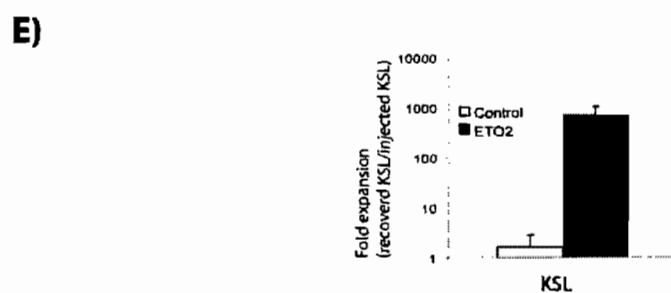
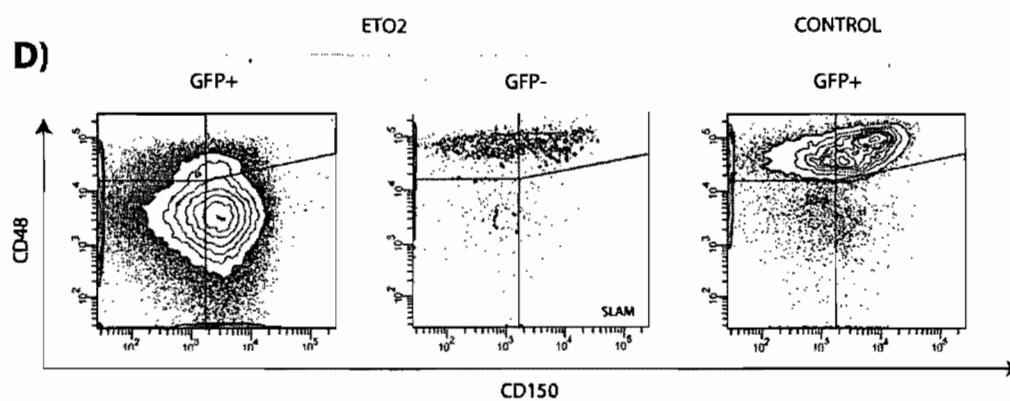
An expansion of either LT-HSC or ST-HSC could in principle give rise to an expansion of the KSL population in vivo. Since our analysis was performed 8 months after transplantation, we have most likely assessed LT-HSC. To further clarify the question whether ETO2 influences the self-renewal of LT-HSC, we proceeded with secondary transplantation (Figure 3-6A). Retroviral integration sites were determined by Southern blotting as markers of clonality. To assess self-renewal, we compared retroviral integration in genomic DNA of bone marrow cells recovered from both primary and secondary transplantations (Figure 3-6B). In primary transplanted mice (lanes 1-8), there are multiple viral integrations of various intensities, a pattern reminiscent of a polyclonal reconstitution. Interestingly, some bands (a, b and c) are shared among primary mice and secondary mice (lanes 9-11), suggesting that self-renewal has occurred in some clones both in vitro and in vivo. Of note, integration patterns are identical in secondary mice (lanes 9-11) and the presence of multiple bands suggests that multiple clones are dominant. As this analysis was done with secondary hosts 6 months after transplantation, we concluded that self-renewal occurred in Long Term-HSC (LT-HSC).

Contrary to primary transplantation, a high proportion of GFP<sup>+</sup> cells were detected in the peripheral blood of mice transplanted with *Eto2*-expressing cells. These, however, did not express lineage markers and were mostly KSL (Figure 3-6C). Analysis of the GFP<sup>+</sup> population in the bone marrow of these mice revealed that these cells were all LIN<sup>-</sup> (data not shown), as found in the peripheral blood, and were mostly CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup> (Figure 3-6D). This SLAM-LIN<sup>-</sup> phenotype (Kiel et al., 2005) is consistent with their functional characteristics as LT-HSC. In contrast, GFP<sup>-</sup> cells were mostly LIN<sup>+</sup> and resemble the phenotype of control cells expressing the empty MSCV vector (Figure 3-6D). As observed in the primary transplantation, we found that ETO2 induces a 1000 fold increase in KSL

cells (Figure 3-6E). To exclude the possibility that this increase in KSL could be due to an effect of ETO2 on ST-HSC, we compared the ratio of KSL over SLAM-LIN<sup>-</sup> of control cells and ETO2-expressing cells (Figure 3-6F, left panel). We reasoned that an activity of ETO2 on ST-HSC would translate into a 1000 fold difference between these two ratios, whereas a specific activity on LT-HSCs would not affect this ratio. We found that the ratio was mostly comparable between control cells and ETO2 expressing cells, indicating that the expansion in the KSL population derives from the expansion within the SLAM-LIN<sup>-</sup> population.

To identify the earliest progenitors that are inhibited by ETO2 overexpression, we analysed CMP (common myeloid progenitors) and CLP (common lymphoid progenitor), representing the earliest committed progenitors during HSC differentiation process (Akashi et al., 2000). The ratio of progenitors per HSC (SLAM) indicates that ETO2 induces an early blockade of myeloid lineages as there is a 40 fold reduction for CMP/HSC in comparison with control cells (Figure 3-6F). In contrast, the ratio of CLP/SLAM was not significantly different between the two groups. These effects are consistent with elevated ETO2 expression in the KSL and CLP populations and indicate that the down regulation of ETO2 is required for early differentiation into the myeloid lineages but not the lymphoid lineages. This blockade is also observed with the GMP/SLAM ratios, indicating that myeloid lineage is impeded at multiple stages.

**A)****B)****C)**



**Figure 3-6. ETO2 promotes HSC self-renewal and prevents early differentiation.**

A) Experimental outlines of analysis performed on secondary transplanted mice. B) oligoclonal reconstitution by ETO2-expressing bone marrow cells. Digested gDNA from ETO2 bone marrow cells was probed with the full length GFP sequence. Lanes 1 to 4 correspond to 4 mice from the primary transplantation (d0), lane 5 from one mouse transplanted with d7 bone marrow cells, and lanes 6 and 7, from 2 secondary transplanted mice (2<sup>nd</sup> Tx). Each letter is indicative of a single viral integration. C) Prevalence of HSC-like cells in the GFP<sup>+</sup> fraction of the peripheral blood of ETO2 mice. FACS analysis was done on GFP<sup>+</sup> population. D) GFP<sup>+</sup> ETO2 transduced cells are highly enriched for SLAM-LIN<sup>-</sup> (C150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>) cells in the bone marrow. In contrast, the GFP<sup>-</sup> fraction from these same mice resembles the GFP<sup>+</sup> fraction of mice transplanted with control cells. E) ETO2-induced expansion of the KSL population in vivo. Data shown are the ratio of output/input KSL 6 months following secondary transplantation. F) ETO2 inhibits the earliest commitment step in HSC. The numbers of CMP, GMP and CLP per HSC (SLAM-LIN<sup>-</sup> population) are decreased by ETO2 expression whereas the numbers of KSL per HSC remain unaffected. Data shown are the median  $\pm$  SD of 3 (ETO2) or 4 (control) mice.

Contrary to the bone marrow, we found GFP<sup>+</sup> cells in the spleen of ETO2 mice that were LIN<sup>+</sup>, although these were lower than control spleens. These observations suggest extra-medullar haematopoiesis that compensates for deficiency in the bone marrow. Nonetheless, ETO2 spleens show hypertrophy (3-4 fold more cells) and contained large numbers of immature cells (Table 3-I), in accordance with the presence of blasts in the peripheral blood. Furthermore, B lineage (B220<sup>+</sup>), as well as T lineage (CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>) cells were decreased in percentage (Table 3-I) and absolute numbers, indicating that the down regulation of ETO2 is required for differentiation to proceed in lymphoid lineages. Together, our observations indicate that ETO2 hinders multi-lineage differentiation.

	ETO2		Control	
Total cell number per spleen	120x10 <sup>6</sup>	+/- 67x10 <sup>6</sup>	39x10 <sup>6</sup>	+/- 12x10 <sup>6</sup>
GFP positive cells :				
CD4 %	1,5	+/- 1,1	25,9	+/- 2,4
CD8 %	7,7	+/- 7,1	14,5	+/- 2,9
B220%	2,6	+/- 3,6	43,8	+/- 16,1
CD11b%	3,1	+/- 5,1	11,0	+/- 14,9
Immature cell % (CD11b-; B220-; CD8-; CD4-)	84,8	+/- 10,4	3,6	+/- 4,2

Table 3-I Flow cytometry analysis of the spleen.

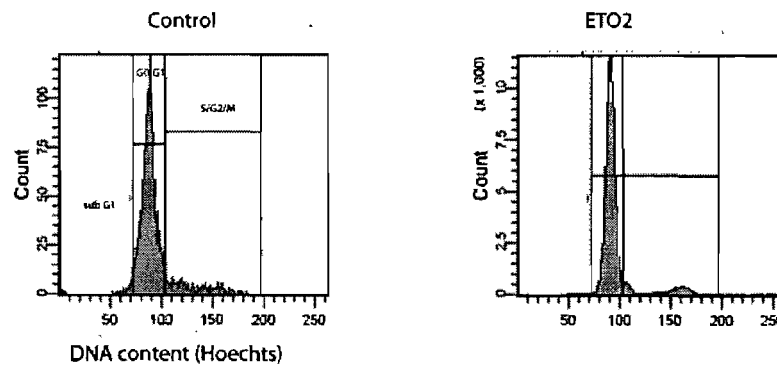
The spleens of mice reconstituted with ETO2-expressing cells contain high numbers of immature hematopoietic cells (CD45.1<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>LIN<sup>-</sup>) whereas the spleens of mice transplanted with control cells contained mostly B and T lymphocytes. Shown are lineage markers within the GFP positive population only.

### 3.4.5 ETO2 does not affect cell cycle distribution or apoptosis

In secondary transplant recipients, ectopic ETO2 expression is characterized by a striking expansion of HSC in the bone marrow. As shown in Figure 3-6D, there is a major enrichment for SLAM-LIN<sup>-</sup> population in the bone marrow. To address the possibility that this expansion may be associated with increased proliferation or decreased apoptosis in

addition to differentiation blockade, we analysed progenitor ( $\text{LIN}^-$ ) and HSC ( $\text{SLAM-LIN}^-$ ), populations for their cell cycle distribution using the Hoechst dye (Fig. 7A-B). Surprisingly, ETO2 and control cells show neither significant difference in the percentages of cycling cells (S-G2-M) or apoptotic cells (sub-G1), neither in progenitors ( $\text{LIN}^-$ ) nor HSCs ( $\text{SLAM-LIN}^-$ ). We therefore conclude that ETO2 expression does not affect cell cycle distribution or apoptosis in primitive populations. Therefore, we propose that ETO2-HSC-expansion is mostly due to a differentiation blockade.

A)



B)

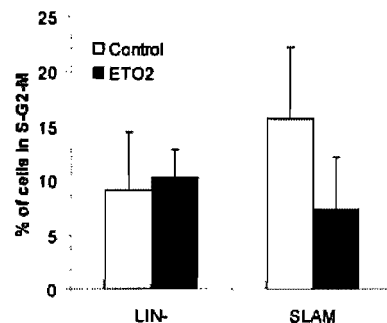


Figure 3-7 The expansion of HSC mediated by ETO2 is not associated with change in proliferation, or apoptosis.

A) Bone marrow cells from secondary transplanted mice were analysed for cell cycle distribution in sub-G1, G0-G1 and S-G2-M phases. Shown are Hoescht staining of  $\text{LIN}^-$  populations. B) Cells populations ( $\text{LIN}^-$  and  $\text{SLAM-LIN}^-$ ) from ETO2 or control mice do not exhibit differences in the percentage of cycling cells.

### **3.5 Discussion**

In the present study, we show that ETO2 is expressed in primitive hematopoietic cells and that ectopic ETO2 expression promotes HSC self-renewal associated with an inhibition of multi-lineage differentiation.

#### **3.5.1 ETO2 increases the HSC pool size mainly by preventing differentiation**

Upon entry into the cell cycle, HSC faces two options: asymmetrical or symmetrical divisions. The first one results in one differentiating and one identical daughter cell, thereby preserving stem cell number and sustaining blood formation, a process referred as self-renewal of maintenance (SR-M). Alternatively, cells undergoing symmetrical divisions can either give rise to two self-renewing cells, expanding the stem cell pool, referred as self-renewal with expansion (SR-E), or to two differentiating cells with a net loss in stem cell number. Thus, the self-renewal division rate directly contributes to the HSC pool size, and to the overall homeostasis of the hematopoietic system.

Most studies were done with the AML1-ETO2 fusion gene while very little is known on ETO2 functions in the hematopoietic system. Nonetheless, we and others have accumulated evidence demonstrating specific roles for ETO2 in normal hematopoiesis. Here, we reveal a new function for ETO2 in sustaining HSC self-renewal by preventing differentiation. This new role for ETO2 is in accordance with our previous findings that ETO2 impedes erythroid differentiation and promotes erythroid progenitor proliferation.

ETO2 initiates a 100-fold ex vivo expansion of HSCs during a 7 day culture period and a 1000-fold in vivo expansion of HSC as assessed by limiting dilution analysis. This expansion is comparable to that mediated by HOXB4. However, there are also some striking differences between HOXB4 and ETO2. Following myeloablative transplantation,



the stem cell pool is reconstituted to 10% of the initial reservoir only (Sauvageau et al., 1995; Pawliuk et al., 1996; Thorsteinsdottir et al., 1999). Upon HOXB4 over-expression in bone marrow cells, the stem cell pool is reconstituted to 100% regardless of cell doses (Thorsteinsdottir et al., 1999), suggesting that HOXB4 strongly reinforces self-renewal cues, in respect of physiological demand, that would not be normally sufficient for a full reconstitution. In contrast, ETO2 expressing cells aberrantly fill the bone marrow and even circulate in the periphery, disregarding bone marrow limits. Unlike HOXB4 cells that can still differentiate and leave the niche (Antonchuk et al., 2002), the differentiation blockade imposed by ETO2 may by itself result in an expansion of the stem cell pool. In addition, diminished differentiation may also perturb bone marrow homeostasis. Indeed, it is believed that differentiating cells would provide negative signals that inhibit HSC proliferation, reflecting limited niche availability (Sauvageau et al., 2004). Since ETO2-overexpressing cells are locked in an undifferentiated state, the lack of negative feedback signals to refrain stem cell proliferation may also cause this huge expansion of the pool of HSCs.

### **3.5.2 ETO2 prevents lymphoid differentiation by blocking E protein function**

Ectopic ETO2 expression does not prevent the generation of early lymphoid progenitors, in accordance with high levels of endogenous *Eto2* expression in CLPs. Together, our observations indicate that ETO2 does not prevent lymphoid lineage commitment. However, ETO2 clearly blocks lymphocyte maturation as evidenced by the absence of GFP<sup>+</sup> B or T lymphocytes in the peripheral blood. Since *Eto2* levels are low in mature lymphoid cells (Lindberg et al., 2005), our functional studies indicate that the down-regulation of *Eto2* gene expression is required for B and T lineage development. E proteins are among the best described regulators of lymphoid development, and are required for B and T lymphocyte maturation (Bain and Murre, 1998). E proteins recruit ETO proteins via their activation domain 1 (AD1), leading to a displacement of p300 and transcription repression (Zhang et al., 2004). Accordingly, ETO2 is recruited to the SCL complex

through direct E protein binding in erythroid and megakaryocyte cell lines (Goardon et al., 2006; Schuh et al., 2005), acting as a platform for co-repressors, including HDACs and N-CoR. Together, the observations are consistent with the view that ETO2 prevents lymphoid differentiation by repressing E protein function.

### **3.5.3 Other regulators associated with differentiation and self-renewal**

Two lineage-affiliated transcription factors have been shown to influence HSC function, PU.1 and C/EBP $\alpha$ . Indeed, loss of PU.1 and C/EBP $\alpha$  allows for increased competitive repopulation by HSCs (Iwasaki et al., 2005; Porse et al., 2005), consistent with their differentiative roles in the myeloid lineages [reviewed by (Friedman, 2007)] that antagonize self-renewal. Notch1 also controls lymphoid differentiation and HSC self-renewal properties (Karanu et al., 2000; Stier et al., 2002). Indeed, Notch1 activation results in differentiation blockade associated with a 10-fold expansion of HSC in vivo. The proliferation rate is not affected in these cells, suggesting that differentiation blockade is responsible for HSC expansion, as reported here for ETO2. Together, these observations are consistent with the view that HSC self-renewal depends at least in part on suppression of multilineage differentiation.

### **3.5.4 ETO2 and leukemia**

Integrity of the bone marrow niche is crucial for HSCs self-renewal (Zhang et al., 2003). Indeed, HSCs that are taken out of their niche are rapidly lost, mainly due to differentiation and also possibly to incapacity to proliferate. However, cells maintained in culture for 7 days can self-renew extensively following ETO2 overexpression (Figure 3-5), suggesting that ETO2 overexpression bypasses the requirement for the bone marrow niche. By preventing differentiation, ETO2 allows HSCs to accumulate, resulting in the expansion of this pool. Interestingly, we report here that the expression of ETO2 is very low in LT-HSC (SLAM), a cell population that has to stay in the bone marrow niche and to respond tightly to this microenvironment. However, ETO2 expression increases markedly in the

KSL population containing a high proportion of ST-HSC, a population that can leave the niche and be found with rhythmic circulation in the periphery (Mendez-Ferrer et al., 2008). It is possible that ETO2 overexpression in LT-HSC interferes with communication between the niche and HSCs, leading to a massive HSC expansion mainly caused by differentiation blockade.

There is a strong correlation of genes associated with expansion and with cancer, in particular with genes associated with differentiation blockade (Tenen, 2003). AML1-ETO and AML1-MTG16 repress transcription and block myeloid differentiation (Lutterbach et al., 1998; Wang et al., 1998; Rossetti et al., 2005). Moreover, human progenitors overexpressing AML1-ETO, a fusion composed of AML1 and ETO [67-75% homology to MTG16a and MTG16b, respectively (Davis et al., 2003)], retain an immature phenotype and show a polyclonal expansion (Mulloy et al., 2002), similarly to what we observed with ETO2 overexpression. As ETO2 compromises HSC differentiation potential, the bone marrow is filled with uncommitted cells associated with a pre-leukemia state (Hope et al., 2003).

It has recently been shown that many of the genes repressed by AML1-ETO are not AML1 target gene (Shimada et al., 2000), while many genes associated with self-renewal (Notch and Wnt pathways) are up-regulated (Muller-Tidow et al., 2004; Alcalay et al., 2003). Thereby, the classical model stipulating that AML1 is converted to a repressor by the fusion with ETO members seems to be far more complex. Our present study support that many of the pre-leukemia effect (HSC expansion and differentiation blockade) is a direct consequence of ETO or ETO2 overexpression that possibly interferes with niche signalling. We propose that, ETO2 is an efficient repressor of lineage associated-genes and forces symmetrical divisions directly by interfering with chromatin accessibility.

### **3.6 Material and Methods**

#### **Mice**

All mice lines were of the C57BL/6 background and maintained under pathogen-free conditions according to institutional animal care and use guidelines. Animal experiments were approved by the Université de Montréal Animal Ethical Committee.

#### **Retroviral Vectors and infection of bone marrow or fetal liver cells**

MSCV-ETO2-PGK-GFP (Goardon et al., 2006), MSCV-HOXB4-IRES-GFP, and the MSCV-IRES-GFP (Antonchuk et al., 2002) vectors were used for generation of retrovirus producing GP<sup>+</sup>E cells, and fetal liver or bone marrow cells transduction was performed as described previously (Sauvageau et al., 1995). Percentage of infection (GFP<sup>+</sup> cells) was determined by FACS analysis using BD LSRII System (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

#### **In Vitro Culture of Transduced BM and fetal liver Cells and transplantation of bone marrow cells**

In vitro culture and transplantation were performed essentially as described previously (Sauvageau et al., 1995). Briefly, after 2 days of co-culture with GP<sup>+</sup>E, bone marrow cells were immediately used for competitive repopulation assay (day0 transplantation) or initiated at a density of 1X10<sup>6</sup> cells/ml, in media supplemented with 15% fetal calf serum (FCS), 6 g/ml of interleukin (IL)-3, 10 ng/ml of IL-6 and 100 ng/ml of stem cell factor (SCF) for an additional 7 days before transplantation (day7 transplantation). Cells were split at day 3 to maintain a cell density of 1 X 10<sup>6</sup> cells per ml. All Cytokines used in this paper were prepared at IRIC as COS cell supernatants. All other media components were purchased from GIBCO/Invitrogen Corp. (Burlington, ON, Canada).

### **Competitive Repopulating Unit (CRU) Assay**

The competitive repopulation assay was performed essentially as previously described (Antonchuk et al., 2001). Briefly, cell doses ranging from  $2 \times 10^3$  to  $2 \times 10^5$  (five mice per group) were injected, along with  $1 \times 10^5$  fresh BM cells for support, into lethally irradiated (850 cGy) Ly5.1 recipients (donor are Ly5.2). Peripheral blood (PB) samples were taken at multiple intervals following transplantation and CRU was determined by FACS analysis. Mice engrafted with greater than 1% donor-derived cells in both lymphoid (B220 and CD3), erythroid (ter119) and myeloid (Gr1 and Mac1) subpopulations were considered positive. CRU frequencies were calculated by applying Poisson statistics to the proportion of negative recipients at different dilution using L-CALC software (StemCell Technologies). Alternatively, CRU frequencies was based on the proportion of mice engrafted with greater than 1% donor-derived cells with GFP<sup>+</sup> and KSL phenotype, to overcome ETO2-mediated differentiation blockade.

### **Flow cytometry**

Freshly isolated cells from BM and fetal spleen cells or peripheral blood cells depleted in red blood cells were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) with 2% FCS and the appropriate antibody mixture: CD45.1-PE-Cy7; CD45.2-PE-Cy5.5; B220-PE-Cy5 or B220-biotin; CD11b-APC, CD11b-PE-Cy7 or CD11b-biotin; CD3-PE or CD3-biotin; ter119-PE or ter119-biotin; c-kit-APC; Sca-PE; Gr-1-biotin; IL-7 Rc-PE-Cy7 (CD127); FcR $\gamma$ -PE-Cy5.5; CD48-APC; and CD150-PE-Cy5. Biotinylated antibodies were detected with streptavidin conjugated either with PE-Cy5, or APC-Cy7. Dead cells were excluded by propidium iodine staining. Cells were analysed on a FACS LSRII instrument (BD Biosciences) using DIVA software (BD Biosciences). All cell sorting was done with the FACS ARIA (BD Biosciences) instrument.

**Cell-cycle analysis using Hoechst 33342**

Isolated bone marrow cells from secondary transplanted mice were incubated for 30 minutes at 37°C in DMEM containing 2% fetal calf serum (FCS), 1mM HEPES pH7.4 and 10 µg/ml of Hoechst 33342 (Molecular Probes). After several washes in PBS supplemented with 2% FCS, cells were stained for SLAM-LIN<sup>+</sup>. FACS analysis was visualized on a linear scale.

**Southern blot**

gDNA from total mouse bone marrow was extracted with DNazol and digested with BamH1. Complete GFP fragment obtained by restriction digestion of MSCV-pgk-GFP plasmid was used to probe the blot.

**Clonogenic Progenitor Assays**

Hematopoietic clonogenic progenitor frequencies were determined by plating suitable aliquots of transduced bone marrow or fetal liver cells in IMDM medium supplemented with 1% methylcellulose, 15% Fetal Calf Serum (FCS) (Gibco), 5.7% of deionized BSA, 200ug/ml Transferrin, 1x10<sup>-4</sup>M β-mercaptoethanol with 50ng/ml SCF, 10ng/ml IL-3, and 10ng/ml IL-6 and 5U/ml of EPO. Colonies were scored after 7 or 10 days of incubation. Cell clusters of more than 50 cells were scored as one colony. To evaluate proliferation potential of colonies, individual colonies were transferred from methylcellulose to liquid cultures and expanded for 10 days in IMDM, supplemented with 10% FCS, IL-3 (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), IL-11 (100 ng/ml), SCF (100 ng/ml), and 10<sup>-5</sup>M β-mercaptoethanol.

**DNA extraction and Polymerase Chain Reaction on bone marrow sorted population**

Bone marrow cells from primary transplanted mice were sorted based on different combinations of cell surface markers to isolate population of each lineage, and uncommitted cell populations. 10 000 cells were recovered for each population. To confirm DNA viral integration, DNA was extracted and PCR amplified using the REDExtract-N-Amp tissue PCR kit (SIGMA). Oligonucleotide sequences for ETO2 integration or control E2F are available upon request. PCR product specificity has been confirmed with internal radioactive probe.

**Western blot**

Total protein extract from sorted GFP<sup>+</sup> spleen cells was ran on 10% acrylamide gel and transfer to PVDF membrane (see (Goardon et al., 2006) for details). ETO2 antibody (C20) and GFP antibody (sc-8334) are from Santa Cruz biotechnology (California).

### 3.7 References

- Akala, O. and Clarke, M.F. (2006). Hematopoietic stem cell self-renewal. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 496-501.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Alcalay, M., Meani, N., Gelmetti, V., Fantozzi, A., Fagioli, M., Orleth, A., Riganelli, D., Sebastiani, C., Cappelli, E., Casciari, C., Sciurpi, M.T., Mariano, A.R., Minardi, S.P., Luzi, L., Muller, H., Di Fiore, P.P., Frosina, G., and Pelicci, P.G. (2003). Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J. Clin. Invest* 112, 1751-1761.
- Antonchuk, J., Sauvageau, G., and Humphries, R.K. (2002). HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* 109, 39-45.
- Antonchuk, J., Sauvageau, G., and Humphries, R.K. (2001). HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Exp. Hematol.* 29, 1125-1134.
- Bain, G. and Murre, C. (1998). The role of E-proteins in B- and T-lymphocyte development. *Semin. Immunol.* 10, 143-153.
- Davis, J.N., McGhee, L., and Meyers, S. (2003). The ETO (MTG8) gene family. *Gene* 303, 1-10.
- Ema, H., Takano, H., Sudo, K., and Nakauchi, H. (2000). In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 192, 1281-1288.
- Fraser, C.C., Szilvassy, S.J., Eaves, C.J., and Humphries, R.K. (1992). Proliferation of totipotent hematopoietic stem cells in vitro with retention of long-term competitive in vivo reconstituting ability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 1968-1972.
- Friedman, A.D. (2007). Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 26, 6816-6828.
- Goardon, N., Lambert, J.A., Rodriguez, P., Nissaire, P., Herblot, S., Thibault, P., Dumenil, D., Strouboulis, J., Romeo, P.H., and Hoang, T. (2006). ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J.* 25, 357-366.



- Hope, K.J., Jin, L., and Dick, J.E. (2003). Human acute myeloid leukemia stem cells. *Arch. Med. Res.* 34, 507-514.
- Iwasaki, H., Somoza, C., Shigematsu, H., Duprez, E.A., Iwasaki-Arai, J., Mizuno, S., Arinobu, Y., Geary, K., Zhang, P., Dayaram, T., Fenyus, M.L., Elf, S., Chan, S., Kastner, P., Huettner, C.S., Murray, R., Tenen, D.G., and Akashi, K. (2005). Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* 106, 1590-1600.
- Karanu, F.N., Murdoch, B., Gallacher, L., Wu, D.M., Koremoto, M., Sakano, S., and Bhatia, M. (2000). The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 192, 1365-1372.
- Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109-1121.
- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Lindberg, S.R., Olsson, A., Persson, A.M., and Olsson, I. (2005). The Leukemia-associated ETO homologues are differently expressed during hematopoietic differentiation. *Exp. Hematol.* 33, 189-198.
- Lutterbach, B., Westendorf, J.J., Linggi, B., Patten, A., Moniwa, M., Davie, J.R., Huynh, K.D., Bardwell, V.J., Lavinsky, R.M., Rosenfeld, M.G., Glass, C., Seto, E., and Hiebert, S.W. (1998). ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors. *Mol. Cell Biol.* 18, 7176-7184.
- McNiece, I.K., Bertoncello, I., Kriegler, A.B., and Quesenberry, P.J. (1990). Colony-forming cells with high proliferative potential (HPP-CFC). *Int. J. Cell Cloning* 8, 146-160.
- Meier, N., Krpic, S., Rodriguez, P., Strouboulis, J., Monti, M., Krijgsvelde, J., Gering, M., Patient, R., Hostert, A., and Grosveld, F. (2006). Novel binding partners of Ldb1 are required for haematopoietic development. *Development* 133, 4913-4923.
- Mendez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., and Frenette, P.S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 452, 442-447.
- Muller-Tidow, C., Steffen, B., Cauvet, T., Tickenbrock, L., Ji, P., Diederichs, S., Sargin, B., Kohler, G., Stelljes, M., Puccetti, E., Ruthardt, M., de Vos, S., Hiebert, S.W., Koeffler, H.P., Berdel, W.E., and Serve, H. (2004). Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol. Cell Biol.* 24, 2890-2904.

- Mulloy, J.C., Cammenga, J., MacKenzie, K.L., Berguido, F.J., Moore, M.A., and Nimer, S.D. (2002). The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood* 99, 15-23.
- Okumura, A.J., Peterson, L.F., Lo, M.C., and Zhang, D.E. (2007). Expression of AML/Runx and ETO/MTG family members during hematopoietic differentiation of embryonic stem cells. *Exp. Hematol.* 35, 978-988.
- Pawliuk, R., Eaves, C., and Humphries, R.K. (1996). Evidence of both ontogeny and transplant dose-regulated expansion of hematopoietic stem cells in vivo. *Blood* 88, 2852-2858.
- Porse, B.T., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Hasemann, M.S., Anderson, K., Damgaard, I., Jacobsen, S.E., and Nerlov, C. (2005). Loss of C/EBP alpha cell cycle control increases myeloid progenitor proliferation and transforms the neutrophil granulocyte lineage. *J. Exp. Med.* 202, 85-96.
- Rossetti, S., Hoogeveen, A.T., and Sacchi, N. (2004). The MTG proteins: chromatin repression players with a passion for networking. *Genomics* 84, 1-9.
- Rossetti, S., Van, U.L., Touw, I.P., Hoogeveen, A.T., and Sacchi, N. (2005). Myeloid maturation block by AML1-MTG16 is associated with Csf1r epigenetic downregulation. *Oncogene* 24, 5325-5332.
- Sauvageau, G., Iscove, N.N., and Humphries, R.K. (2004). In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene* 23, 7223-7232.
- Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Eaves, C.J., Lawrence, H.J., Largman, C., Lansdorp, P.M., and Humphries, R.K. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev.* 9, 1753-1765.
- Schuh, A.H., Tipping, A.J., Clark, A.J., Hamlett, I., Guyot, B., Iborra, F.J., Rodriguez, P., Strouboulis, J., Enver, T., Vyas, P., and Porcher, C. (2005). ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. *Mol. Cell Biol.* 25, 10235-10250.
- Shimada, H., Ichikawa, H., Nakamura, S., Katsu, R., Iwasa, M., Kitabayashi, I., and Ohki, M. (2000). Analysis of genes under the downstream control of the t(8;21) fusion protein AML1-MTG8: overexpression of the TIS11b (ERF-1, cMG1) gene induces myeloid cell proliferation in response to G-CSF. *Blood* 96, 655-663.
- Stier, S., Cheng, T., Dombkowski, D., Carlesso, N., and Scadden, D.T. (2002). Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 99, 2369-2378.

- Tenen, D.G. (2003). Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat. Rev. Cancer* 3, 89-101.
- Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., and Humphries, R.K. (1999). Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood* 94, 2605-2612.
- Uchida, N., Dykstra, B., Lyons, K.J., Leung, F.Y., and Eaves, C.J. (2003). Different in vivo repopulating activities of purified hematopoietic stem cells before and after being stimulated to divide in vitro with the same kinetics. *Exp. Hematol.* 31, 1338-1347.
- Wang, J., Hoshino, T., Redner, R.L., Kajigaya, S., and Liu, J.M. (1998). ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 10860-10865.
- Zhang, J., Kalkum, M., Yamamura, S., Chait, B.T., and Roeder, R.G. (2004). E protein silencing by the leukemogenic AML1-ETO fusion protein. *Science* 305, 1286-1289.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., Harris, S., Wiedemann, L.M., Mishina, Y., and Li, L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-841.

## **4 Discussion générale**

Le facteur SCL est impliqué dans plusieurs fonctions essentielles hématopoïétiques, allant de l'établissement des cellules souches jusqu'à la maturation terminale des cellules érythrocytaires. Ces fonctions seraient impossibles sans l'association de SCL avec d'autres partenaires protéiques. Les différents partenaires formant le complexe modifient son comportement, permettant une grande flexibilité dans la régulation génique. Le but premier de mon projet de thèse était de faire une analyse systématique des complexes transcriptionnels SCL, afin de dévoiler de nouveaux mécanismes d'action et de comprendre globalement la régulation transcriptionnelle du système hématopoïétique.

J'ai d'abord utilisé une approche de purification de complexes en conditions physiologiques afin d'identifier de nouveaux partenaires de SCL. Cette purification m'a conduite à plusieurs découvertes et constatations intéressantes. Mes analyses protéomiques en spectrométrie de masse (voir chapitre 2 et Annexe I) apportent de nouvelles preuves que les complexes SCL sont dynamiques. La transition entre les différents états de différenciation implique des échanges de co-facteurs, tels que les HDACs et les TRRAPs. J'ai aussi révélé que SCL ne s'associe pas strictement avec E2A dans les cellules érythrocytaires, mais aussi avec les protéines HEB et E2-2 de la même famille. D'ailleurs, ma purification par TAP-TAG suggère plutôt que HEB serait le partenaire principal de SCL dans la lignée érythrocytaire (voir Annexe I).

L'identification du co-répresseur ETO2 au sein du complexe SCL représente la plaque tournante de mon projet. La découverte d'ETO2 m'a permis de révéler un nouveau mécanisme de contrôle transcriptionnel basé sur le ratio stœchiométrique activateurs/co-répresseurs. En liant le complexe SCL, et vraisemblablement d'autres cibles, ETO2 gouverne la transition prolifération/différenciation des précurseurs érythrocytaires. Ensuite, l'étude de la fonction d'ETO2 dans les cellules souches révèle qu'elle occupe une place centrale dans l'auto-renouvellement, principalement en bloquant les voies de différenciation. L'analyse protéomique non biaisée des complexes SCL s'est donc avérée pertinente et révélatrice de la régulation transcriptionnelle et la biologie du système hématopoïétique.

## 4.1 Les complexes SCL/ETO2 dans l'érythropoïèse

### 4.1.1 Identification de nouveaux partenaires aux fonctions variées

Mon analyse des complexes SCL dans la lignée érythrocytaire visait l'identification de complexes SCL dans des cellules non-différenciées et différenciées. La purification de complexes physiologiques et l'analyse subséquente en spectrométrie de masse a permis de révéler plusieurs nouveaux partenaires dynamiques, dont les fonctions sont associées à la transcription, la modification de la chromatine et la réparation de l'ADN. Outre la purification de complexes publiée [voir chapitre 2 (Goardon et al., 2006)], j'ai aussi effectué une seconde purification selon la méthode du *tandem affinity purification-tag* (TAP-TAG ; voir annexe I). Cette purification dans des cellules TF-1 non différenciées m'a permis de confirmer les partenaires identifiés avec une autre approche en plus d'en identifier de nouveaux.

#### 4.1.1.1 Les protéines E et les complexes SCL

Mon étude de SCL dans les cellules érythrocytaires démontre pour la première fois qu'E2A n'est pas l'unique partenaire d'hétérodimérisation de SCL dans cette lignée (chapitre 2 ; (Goardon et al., 2006) et annexe I). En effet, les études antérieures des complexes SCL de la lignée érythrocytaire n'ont pas été faites dans un contexte d'analyse globale, mais plutôt en vérifiant la présence ou l'absence de partenaires sélectionnés. Dans tous les cas rapportés dans la littérature, seulement la protéine E2A est analysée, expliquant probablement pourquoi il s'agit du seul partenaire de SCL décrit dans cette lignée. Notre analyse par spectrométrie de masse nous a permis de révéler que HEB est un partenaire de SCL aussi important qu'E2A, sinon plus. En effet, à la lumière de ma purification TAP-TAG (annexe I), l'abondance de HEB au sein du complexe est plus importante que celle d'E2A et E2-2, ce dernier étant minoritaire. Ces différences d'affinité entre SCL et les protéines E avaient déjà été démontrées par des analyses de *yeast-two-hybrid*, concluant que la protéine E2-2 présentait l'interaction la moins forte (Goldfarb et al., 1996). Notre

laboratoire a aussi démontré que la perte de HEB affecte légèrement plus la fonction érythrocytaire que la perte de E2A (Desrosiers et al., 2008). Cette étude, ainsi que mon analyse en spectrométrie de masse, mettent bien en évidence le rôle de HEB dans le complexe SCL et la différenciation érythrocytaire. Il est possible que l'interaction avec chacune des protéines E apporte une flexibilité au complexe. L'échange avec différents partenaires protéines E permettrait une régulation fine du complexe, à l'instar du contrôle apporté par l'échange des protéines GATA-1 et GATA-2.

#### **4.1.1.2 Les modificateurs de la chromatine et les autres protéines nouvellement identifiées**

L'analyse a aussi permis de révéler la présence de modificateurs de la chromatine, plus particulièrement des protéines aux pouvoirs acétylants (TRRAP et BRD1) et désacétylants (HDAC1 et HDAC2). Il est intéressant de constater que les protéines acétylantes, associées à l'activation transcriptionnelle, sont retrouvées abondamment avec le complexe SCL dans les cellules différenciées ; tandis que les protéines désacétylantes sont majoritaires dans les cellules non-différenciées, suggérant que les co-facteurs soient échangés au cours de la maturation cellulaire.

J'ai aussi révélé la présence des protéines de type *Sequence-Specific Single-Stranded DNA Binding Protein* (SSDP ; voir Chapitre 2 et Annexe 1). La protéine SSDP1 possède une activité transcriptionnelle dont la fonction précise n'a pas encore été définie (Wu, 2006). Il est intéressant de noter que SSDP1 interagit avec LDB1 chez les mammifères et la drosophile (van Meyel et al., 2003; Chen et al., 2002). Chez cette dernière, l'interaction de SSDP1 et Chip, l'homologue de LDB1, est déterminante pour le développement des ailes (Chen et al., 2002), suggérant l'importance de cette interaction pour les processus de différenciation. À la lumière de ces observations, je suggère que SSDP1 soit recruté au complexe SCL via LDB1, pouvant ainsi réguler la fonction du complexe dans la différenciation érythrocytaire (Xu et al., 2007).

Au cours de mon analyse TAP-TAG, j'ai identifié la présence des facteurs EF-1 $\alpha$  et HSP73. Le facteur EF-1 $\alpha$  est une sous-unité du complexe traductionnel d'élongation EF-1 et est impliqué dans l'ancrage de l'ARNt-aminoacyl au site A du ribosome. Ce facteur est principalement retrouvé au niveau du cytoplasme. Toutefois, il peut aussi être nucléaire où il interagirait avec la protéine doigt de zinc ZPR1, lui conférant des fonctions dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Ejiri, 2002; Gangwani et al., 1998). La protéine ZPR1 est localisée dans le cytoplasme des cellules quiescentes, puis transloquée au noyau suite au traitement avec des agents mitogènes (Galcheva-Gargova et al., 1996). La perte ou la diminution de fonction de ZPR1 engendre des défauts de la transcription, de la synthèse d'ADN, conduisant à l'accumulation de cellules en phase G<sub>1</sub>-G<sub>2</sub> du cycle cellulaire (Gangwani, 2006). Son interaction avec le facteur EF-1 $\alpha$  est essentielle pour la progression normale du cycle cellulaire (Gangwani et al., 1998). La présence d'EF-1 $\alpha$  au sein du complexe SCL suggère que le contrôle prolifératif exercé par le complexe puisse se faire en partie par sa liaison avec EF-1 $\alpha$ . Toutefois, la pertinence de cette interaction pour les érythrocytes et le système hématopoïétique devra être validée, entre autre, par une meilleure caractérisation de l'interaction et des études de gain et perte de fonction.

La protéine HSP73 (*Heat Shock Protein*) est exprimée dans la plupart des tissus, à tous les stades de développement. Elle fait partie de la grande famille de chaperonnes HSP70. Cette famille lie les polypeptides naissants afin d'assurer leur repliement et agit aussi comme ATPase dans le démantèlement des vésicules de clathrine durant le transport des composants membranaires à travers la cellule. Un signal de localisation nucléaire permet à la protéine de se retrouver au noyau où elle est possiblement impliquée dans le maintien des structures protéiques (Tsukahara and Maru, 2004), justifiant pourquoi j'ai pu la trouver associée aux complexes SCL nucléaires. Lam et ses collègues ont démontré que la différenciation érythrocytaire corrèle avec une augmentation des niveaux d'ARNm de HSP73 dans la lignée érythroleucémique K562 (Lam et al., 2000). Le blocage de la différenciation par la surexpression de Notch inhibe cette augmentation, sans toutefois affecter les niveaux de SCL ou GATA-1. La modulation des niveaux de HSP73 pourrait



affecter le comportement du complexe SCL et ainsi directement affecter la différenciation. Il est possible que HSP73 optimise l'effet du complexe en préservant le bon repliement des protéines, un mécanisme suggéré par la protection que confère cette protéine aux agents toxiques. Le groupe de Pasquet a démontré que la surexpression de HSP70, de la même famille que HSP73, confère la résistance à l'imatinib (Pocaly et al., 2007), un agent utilisé dans le traitement des leucémies CML (*chronic myeloid leukemia*). De plus, ils ont observé que les cellules de patients résistants à l'imatinib présentent d'importants niveaux d'expressions de HSP70, suggérant que HSP70 fait partie de la voie moléculaire responsable de la résistance à l'imatinib, possiblement en protégeant la structure des protéines. HSP73 pourrait agir à titre de protecteur du complexe SCL afin de préserver ses fonctions.

Afin de valider la spécificité d'interaction de HSP73 et EF-1 $\alpha$  avec le complexe SCL, j'ai effectué un essai de liaison sur le promoteur de la glycophorine A (données non présentées). Mes résultats suggèrent que la liaison de HSP73 ou de EF-1 $\alpha$  au complexe SCL n'est pas spécifique au complexe SCL, puisque je détecte leur présence sur un promoteur de la GPA sauvage et muté, non lié par le complexe SCL (données non montrées). Conséquemment, il se pourrait que la liaison de HSP73 ou de EF-1 $\alpha$  au complexe SCL soit indépendante de leur liaison au promoteur de la glycophorine A ou soit simplement artéfactuelle. Le facteur EF-1 $\alpha$  est la protéine la plus abondante dans les cellules : elle représente de 1 à 2 pourcents des extraits protéiques totaux. Il sera donc important de vérifier leur présence au sein du complexe SCL sur d'autres promoteurs et d'évaluer si elles ont des fonctions sur les complexes libres dans la cellule.

#### **4.1.1.3 L'identification de ETO2, un co-répresseur affectant plusieurs sphères hématopoïétiques**

Parmi les nouveaux candidats identifiés par spectrométrie de masse se trouve le co-répresseur transcriptionnel ETO2. Mes recherches ont permis de démontrer que cette protéine, d'abord isolée dans un contexte leucémique, s'avère être un régulateur important

de l'hématopoïèse normale. À l'instar de SCL, ETO2 module les fonctions biologiques des cellules souches et des cellules érythrocytaires. Grâce à cette découverte, il est maintenant possible de connecter les réseaux protéiques de SCL et ETO2 (voir Figure 4-1) et d'avoir une meilleure vue d'ensemble des régulateurs hématopoïétiques. Étant donné qu'ETO2 est une plateforme de recrutement de modificateurs de la chromatine, sa présence au sein du complexe SCL permet l'ancrage de nombreux co-répresseurs, dont on ne connaissait pas encore les mécanismes de recrutement.

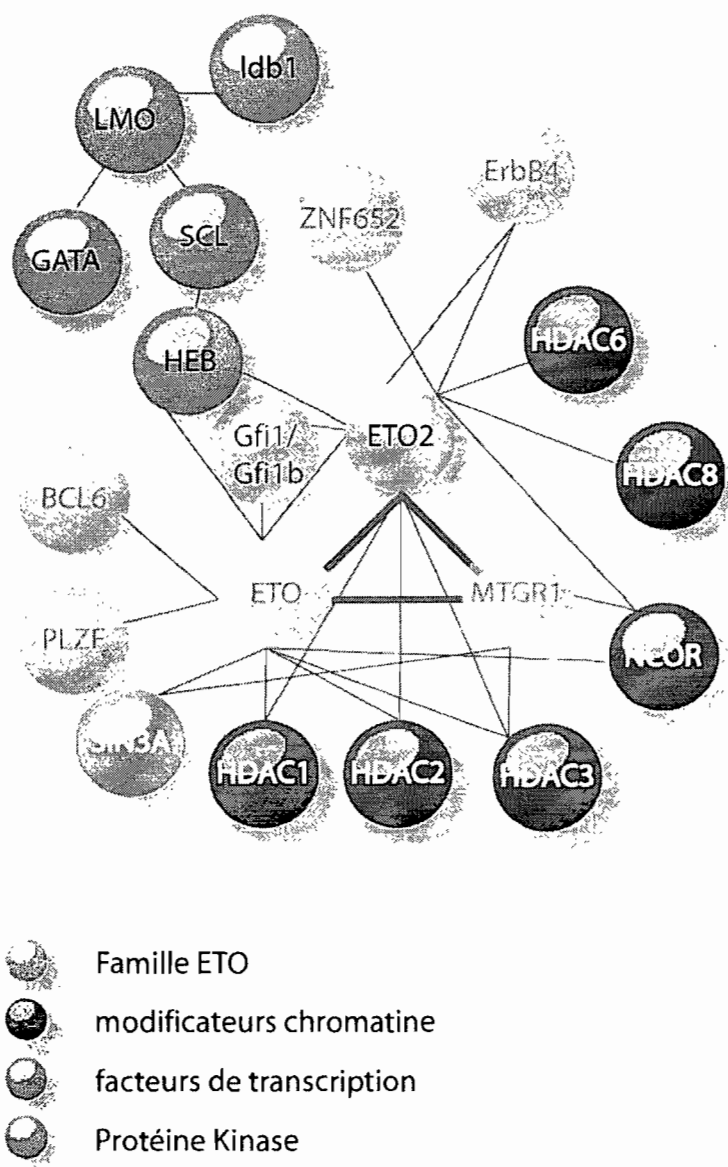


Figure 4-1. Interaction des réseaux protéiques ETO2 et SCL

Le complexe SCL interagit avec ETO2 par l'intermédiaire de HEB ou E2A, rendant possible l'interaction avec plusieurs modificateurs de la chromatine, tels les HDACs.

#### **4.1.1.4 ETO2 gouverne la différenciation et la prolifération des cellules érythrocytaires**

Mes recherches montrent qu'ETO2 stimule la prolifération des progéniteurs en réprimant les gènes associés avec l'arrêt du cycle cellulaire (*p21* et *Gfi-1b*). Simultanément, ETO2 réprime des gènes associés à la différenciation cellulaire, dont les promoteurs sont liés par le complexe SCL (voir modèle en Figure 4-2). Cette double action permet à la fois d'inhiber la différenciation et de stimuler la prolifération des progéniteurs érythrocytaires. Étant donné que les érythrocytes matures ne prolifèrent plus et qu'ils possèdent un court temps de vie, leur nombre dépend directement de la quantité de progéniteurs produits. En coordonnant la différenciation et la prolifération des progéniteurs, ETO2 contribue donc à l'homéostasie de la lignée érythrocytaire. Concurrément à notre identification d'ETO2, le groupe du Dr. Porcher analyse aussi la composition des complexes SCL et fait la même découverte (Schuh et al., 2005). Leur étude apporte aussi des évidences qu'ETO2 bloque la différenciation érythrocytaire, sans toutefois démontrer l'effet sur la prolifération. Ces découvertes indépendantes confirment hors de tout doute le rôle d'ETO2 au sein du complexe SCL et son importance pour la lignée érythrocytaire.

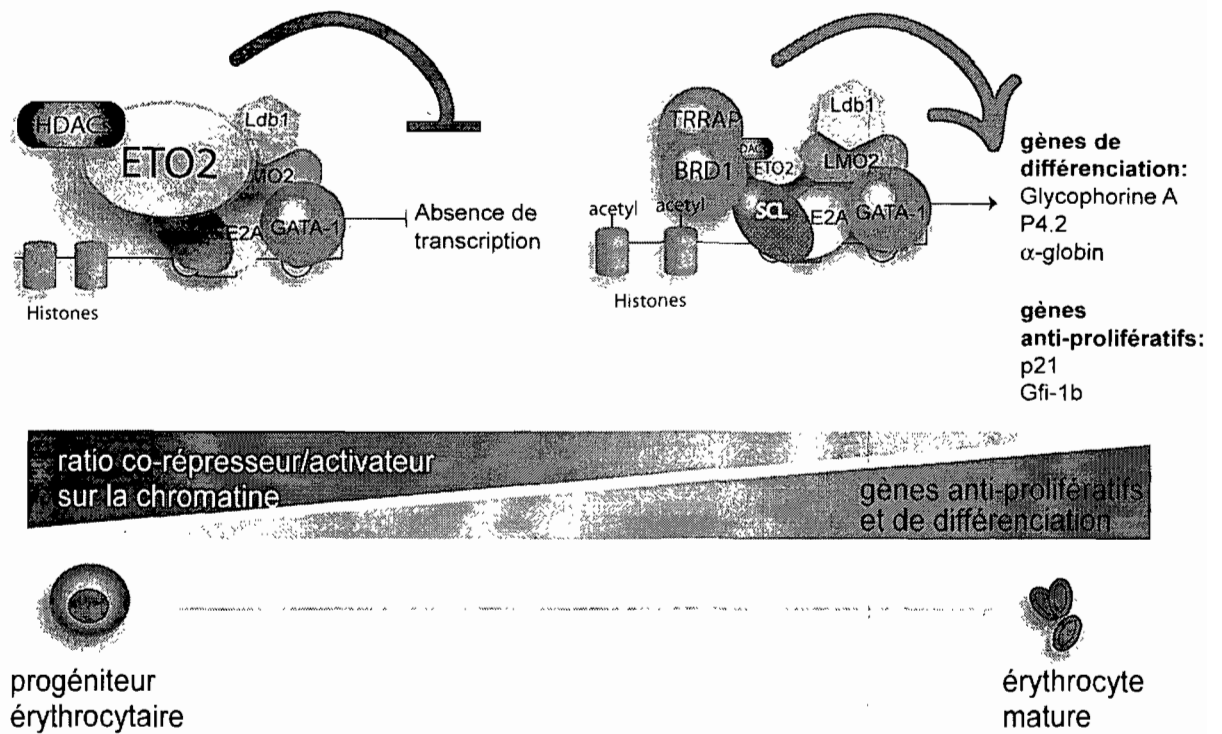


Figure 4-2. ETO2 régule la prolifération et la différenciation des cellules érythrocytaires

Le ratio co-répresseurs/activateurs (ETO2/SCL) dans les progéniteurs est plus important que dans les cellules différenciées, empêchant ainsi l'expression des gènes de différenciation et de prolifération sous le contrôle des complexes SCL. Par contre, ce ratio est inversé dans les cellules plus matures, permettant l'expression des gènes érythrocytaires.

#### 4.1.1.5 L'occupation d'ETO2 aux promoteurs diminue avec la différenciation

Au cours de la différenciation des érythrocytes, la présence d'ETO2 au sein du complexe SCL diminue. Le mécanisme par lequel la présence d'ETO2 diminue n'est pas clair. Il est possible qu'il s'agisse simplement d'une baisse d'expression du messenger ETO2, tel qu'observé dans les cellules érythrocytaires en différenciation (voir chapitre 2, figure S2). J'ai de plus noté que la surexpression d'ETO2 dans les cellules TF-1 abaissait les niveaux d'expression protéique de SCL (voir annexe II). Tel que discuté dans l'introduction, ces boucles de régulation croisée permettent un ajustement précis des programmes génétiques. En régulant négativement SCL, ETO2 privilégie les ratios co-répresseurs/activateurs et renforce ainsi sa fonction biologique.

La diminution d'ETO2 au promoteur pourrait aussi résulter de modifications post-traductionnelles altérant ses options d'interaction. Il est connu que l'acétylation de SCL par le co-activateur P/CAF favorise son interaction avec p300/CBP et est requise pour la différenciation érythrocytaire (Huang et al., 1999; Huang et al., 2000). Également, la protéine AML1-ETO, par le recrutement de HDACs, empêche l'acétylation de GATA-1, provoquant le blocage de son activité transcriptionnelle et de la différenciation érythrocytaire (Boyes et al., 1998; Hung et al., 1999). L'acétylation des protéines est donc un thème récurrent dans la régulation du complexe SCL et la différenciation érythrocytaire. Mes études en spectrométrie de masse n'ont toutefois pas permis de constater de changement dans l'état de la protéine ETO2 au cours de la différenciation. Un protocole de spectrométrie de masse optimisé pour détecter les modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, méthylation et ubiquitination) permettrait de répondre à cette question.

#### 4.1.1.6 La répression par ETO2 : un modèle d'échange ou de ratios stoichiométriques ?

Le recrutement de modificateurs de la chromatine aux complexes transcriptionnels permet d'activer ou de réprimer la transcription. L'étude du comportement des récepteurs nucléaires d'hormones a permis d'élaborer un modèle d'échange de co-facteurs [revu par (Perissi and Rosenfeld, 2005)]. Brièvement, ce modèle classique repose sur le principe d'échange entre les facteurs de répression, tels les HDACS, et les facteurs d'activation, tels les HAT, expliquant les transitions entre les états répressifs et activateurs des complexes transcriptionnels. Ce modèle classique est d'ailleurs très bien appuyé par l'exemple d'AML1-ETO. Dans les cellules leucémiques, l'interaction entre le co-activateur p300 (HAT) et les protéines E serait échangée pour l'interaction AML1-ETO/protéine E, par des résidus proximaux du domaine AD1 des protéines E et le domaine NHR1 de ETO. Ainsi, les protéines E échangent le partenaire p300 pour AML1-ETO, permettant la répression transcriptionnelle des gènes-cibles de E2A (Zhang et al., 2004a). À la lumière de cette observation, le groupe de Porcher a vérifié si la répression par ETO2 résultait aussi de la perte de l'interaction des protéines E/p300 (Schuh et al., 2005). Toutefois, p300 n'a pas été détecté dans leur essai, ni dans notre analyse en spectrométrie de masse, suggérant que d'autres co-activateurs comme ceux que nous avons identifiés (TRRAP et BRD1) sont à la base de l'activation transcriptionnelle et qu'il ne s'agit pas nécessairement du modèle classique d'échange.

À la lumière des expériences que j'ai réalisées, je propose plutôt que les complexes SCL obéissent plus aux lois de la stœchiométrie qu'au modèle de l'échange des co-facteurs. En effet, j'ai observé la présence d'ETO2 dans les complexes SCL dans les cellules différenciées et non différenciées, et ce, tant au sein de complexes fixés à leurs gènes-cibles (capture *in vitro* à l'ADN et *ChIP*) ou libres dans la cellule (TAP-TAG et SCL-biotinylé). La différence entre les cellules différenciées et non différenciées reposent sur l'abondance relative des protéines. Au cours de la différenciation, l'occupation d'ETO2 (co-répresseur) sur les promoteurs érythrocytaires diminue, tandis que celles de HEB et SCL (activateurs)

augmentent. Bien que je n'aie pas établi le seuil exact d'activation transcriptionnelle, mes observations basées la liaison au promoteur *in vitro* (capture à l'ADN) et *in vivo* (immunoprécipitation de la chromatine) suggèrent que les variations de stœchiométrie entre les co-répresseurs et les activateurs dirigent l'activation transcriptionnelle. Je ne réfute toutefois pas totalement le modèle d'échange classique. En effet, cette variation de stoichiométrie pourrait résulter en un échange de HDACs, observée dans les cellules immatures, contre des HAT (cellules différenciées). L'analyse d'autres complexes transcriptionnels comprenant à la fois des activateurs et des répresseurs permettra de supporter notre modèle où le dosage de chacun des éléments détermine la réponse transcriptionnelle.

## 4.2 ETO2 et les cellules souches

La surexpression d'ETO2 dans des cellules de la moelle osseuse m'a permis de révéler la fonction d'ETO2 sur l'auto-renouvellement des cellules souches. En bloquant la différenciation, ETO2 arrive à fermer la valve de ce compartiment qui ne peut alors plus s'échapper vers d'autres lignées, créant une congestion de cellules souches dans la moelle osseuse. Il est intéressant de constater que la fusion AML1-ETO engendre des effets similaires, soit l'expansion des cellules immatures et le blocage de la différenciation (Elagib and Goldfarb, 2007). Dans le cas d'AML1-ETO, le blocage affecte toutes les lignées sanguines (de Guzman et al., 2002; Fenske et al., 2004), avec un effet prédominant sur la voie granulocytaire (Ahn et al., 1998; Westendorf et al., 1998; Kohzaki et al., 1999; Burel et al., 2001; Shimada et al., 2002). Tout comme la surexpression d'ETO2, l'expression de AML1-ETO dans une population enrichie en cellules souches ne produit pas de leucémies, mais stimule la prolifération des cellules souches et des progéniteurs, conduisant à l'apparition de *blasts* dans le sang et la moelle osseuse (de Guzman et al., 2002; Fenske et al., 2004). La grande similitude des phénotypes ETO2 et AML1-ETO suggère que les protéines ETOs contribuent fortement au phénotype AML1-ETO et le développement des leucémies. De plus, les deux protéines de fusion AML1-ETO ou AML1-ETO2 comprennent les protéines complètes d'ETO, suggérant que tous les



domaines d'ETO soient importants pour l'expansion des cellules souches et, subséquemment, pour le développement des leucémies.

Les cellules AMLs proviendraient des cellules souches hématopoïétiques (Bonnet and Dick, 1997; Miyamoto et al., 2000), suggérant que leur expansion par AML1-ETO représente un premier événement dans l'évolution de la maladie, puisque d'autres événements collaborateurs seront ensuite nécessaires pour le développement de la maladie. L'effet d'expansion d'ETO2 dans les cellules souches appuie fortement ce concept de la cellule souche cancéreuse. Mes analyses confirment aussi les résultats d'expression globales montrant que la plupart des gènes exprimés différemment suite à l'exposition d'AML1-ETO ne correspondent pas à des gènes-cibles de AML1 (Shimada et al., 2000; Dunne et al., 2006). Je propose donc que la nature combinatoire des protéines ETOs permette leur association avec plusieurs facteurs de transcription, dont SCL et E2A/HEB, provoquant le chamboulement de l'expression d'une multitude de programmes génétiques.

#### **4.2.1 Perspectives : démontrer qu'ETO2 affecte réellement les cellules souches**

La cellule souche hématopoïétique est définie selon trois caractéristiques: 1) son potentiel prolifératif élevé, 2) son auto-renouvellement et 3) son potentiel de se différencier en toutes les lignées hématopoïétiques. Trop souvent, les analyses fonctionnelles des cellules souches sont uniquement basées sur cette troisième propriété. Cette interprétation hâtive que les effets observés dans les lignées matures reflètent nécessairement le compartiment des cellules souches introduit un biais important dans notre compréhension de la biologie des cellules souches. En effet, comment distinguer un effet qui a lieu dans les progéniteurs multi-potents ou les cellules souches, uniquement en mesurant le pouvoir de reconstitution en cellules matures? Idéalement, l'étude des cellules souches devraient toujours reposer à la fois sur le potentiel de différenciation, mais aussi sur des marqueurs phénotypiques distinguant les cellules souches des progéniteurs. Les récepteurs de surface LIN, C-KIT, SCA-1 et les *Signaling Lymphocyte Activation Molecule* (SLAM; dont

CD150 et CD48) sont très utiles à cette fin. Par exemple, une cellule sur trois de type LIN<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup> et CD150<sup>+</sup> (ou LIN<sup>-</sup>SLAM) est capable de reconstituer à long terme un hôte irradié ; cette population est donc considérée comme hautement enrichie en cellules souches (Kiel et al., 2005).

Afin d'affirmer qu'ETO2 affectait bien les cellules souches, j'ai étudié les cellules LIN<sup>-</sup>SLAM, une population hautement enrichie en cellules souches (Kiel et al., 2005). Toutefois, comme ETO2 bloque la différenciation, je n'ai pu utiliser leur potentiel de différenciation comme critère afin de confirmer que l'effet sur de LIN<sup>-</sup>SLAMs résulterait en une reconstitution augmentée en cellules matures. Afin de démontrer qu'ETO2 augmente l'auto-renouvellement des cellules souches et non seulement la prolifération des cellules KSL ou des LIN<sup>-</sup>SLAM, il sera important de démontrer fonctionnellement que les cellules affectées ont le potentiel de se différencier suivant la diminution des niveaux d'ETO2. L'utilisation d'ARNsh dirigés contre ETO2 permettra d'abaisser ses niveaux et libérera possiblement le potentiel de différenciation des cellules souches. Alternativement, l'utilisation d'inhibiteurs des HDACs, comme le sodium butyrate, permettra d'inhiber la fonction répressive d'ETO2 et révélera le potentiel de différenciation des cellules souches. Cette approche déjà utilisée avec succès pour démontrer l'importance du recrutement des HDACs dans le blocage de différenciation par AML1-ETO (Wang et al., 1999) aurait aussi l'avantage de démontrer que l'effet d'ETO2 sur l'auto-renouvellement et la différenciation provient de sa capacité à recruter les HDACs.

#### **4.2.2 ETO2 et les voies potentielles pour promouvoir l'auto-renouvellement**

J'ai démontré qu'ETO2 stimulait l'auto-renouvellement des cellules souches, principalement en bloquant la différenciation des lignées myéloïdes, lymphoïdes et mégakaryocytaires. Le chapitre 2 présente la mécanistique par laquelle ETO2 inhibe la voie érythrocytaire. Toutefois, les mécanismes par lesquels ETO2 bloque les voies myéloïdes et lymphoïdes demeurent encore obscurs (chapitre 3). En comparant les phénotypes ETO2

avec ceux de facteurs impliqués dans la différenciation et l'auto-renouvellement, il est possible d'identifier des voies moléculaires possibles agissant de concert avec ETO2. Dans la section suivante, je présente les candidats intéressants, dont le rôle avec ETO2 reste à confirmer, mais dont plusieurs évidences suggèrent qu'ils agissent au sein de la même voie.

#### 4.2.2.1 SCL et GATA-1

Dans les cellules érythrocytaires, ETO2 interfère avec la fonction SCL essentielle au développement érythrocytaire (chapitre 2). J'ai démontré qu'en liant les complexes SCL fixés sur les promoteurs de ses gènes-cibles, ETO2 empêche l'activation de la transcription et ainsi permet la prolifération des progéniteurs. De plus, j'ai aussi observé qu'ETO2 exerçait un contrôle négatif sur la transcription de *Scf* (annexe II). En diminuant l'expression de *Scf* et en réprimant l'expression de ses gènes-cibles, ETO2 bloque la différenciation érythrocytaire.

Une autre cible érythrocytaire d'ETO2 est potentiellement le facteur de transcription GATA-1. Cliniquement, les leucémies associées avec la fusion AML1-ETO présentent des défauts de différenciation érythropoïétique en rapport avec les dysfonctionnements de GATA-1 (Yamasaki et al., 1995; Kojima et al., 1998; Schwieger et al., 2002; Fenske et al., 2004). En conditions normales, la protéine GATA-1 doit être acétylée par le facteur p300/CBP afin que la différenciation ait lieu (Boyes et al., 1998; Hung et al., 1999). Par contre, en présence de la fusion AML1-ETO, l'acétylation de GATA-1 n'a pas lieu, ayant pour conséquence un blocage de la différenciation (Choi et al., 2006). Un mutant de GATA-1 acétylé constitutivement est capable de surmonter ce blocage (Choi et al., 2006). Comme ETO2 est recrutée aux complexes SCL/GATA (chapitre 2), et donc physiquement à proximité de GATA-1, il est possible que les HDACs désacétylent GATA-1, contribuant au blocage de la différenciation. Ainsi, ETO2 inhiberait la fonction de deux régulateurs clés de l'érythropoïèse, SCL et GATA-1, par des mécanismes distincts.

#### 4.2.2.2 C/EBP- $\alpha$

Le facteur de transcription C/EBP- $\alpha$  est un régulateur central de la granulopoïèse (Radomska et al., 1998). Il est exprimé dans les cellules myéloïdes où il est un régulateur de l'expression de plusieurs gènes de différenciation (Tenen et al., 1997). Les souris C/EBP- $\alpha^{-/-}$  meurent au stade embryonnaire ou peu après la naissance, dû à un blocage de la granulopoïèse et l'accumulation de cellules immatures dans le foie et le sang périphérique, des caractéristiques typiques des leucémies AMLs chez l'humain (Zhang et al., 1997). La perte conditionnelle de C/EBP- $\alpha$  stimule l'expansion des cellules souches de la moelle osseuse (Zhang et al., 2004b), à l'instar de ce que j'ai observé avec la surexpression d'ETO2 (chapitre 3). C/EBP- $\alpha$  et ETO2 pourraient donc potentiellement agir au sein de la même voie moléculaire. De surcroît, la surexpression d'ETO dans des pré-adipocytes ou d'AML1-ETO dans les cellules hématopoïétiques inhibent la transcription de C/EBP- $\alpha$  (Rochford et al., 2004; Westendorf et al., 1998), suggérant que C/EBP- $\alpha$  représente une cible de régulation d'ETO2. En bloquant l'expression de C/EBP- $\alpha$ , ETO2 régulerait négativement les gènes associés à la différenciation des granulocytes, expliquant la baisse des GMP observée. Je ne peux toutefois pas attribuer à C/EBP- $\alpha$  la baisse des CMP lors de la surexpression d'ETO2 (chapitre 3), puisque la perte de fonction de C/EBP- $\alpha$  n'entraîne pas de diminution des CMP, seulement des GMP. Il sera important de vérifier les niveaux d'expression de C/EBP- $\alpha$  dans les cellules surexprimant ETO2 afin de vérifier si ses niveaux sont abaissés. Il est aussi possible qu'ETO2 contrôle d'autres gènes myéloïdes, tels que PU.1, dont l'interaction avec ETO2 restent à élucider.

#### 4.2.2.3 E2A/HEB

ETO2 est recrutée au complexe SCL via son interaction directe avec les protéines E (Chapitre 2), suggérant que la surexpression d'ETO2 interfère directement avec la fonction des protéines E. Le groupe de Roeder a d'ailleurs démontré qu'un des mécanismes leucémogéniques d'AML1-ETO était la perte de fonction des protéines E (Zhang et al., 2004a). Les protéines E sont des régulateurs essentiels pour le développement des cellules

B et T. Lors de la surexpression d'ETO2, je n'observe pas de baisse significative des CLPs, corrélant avec un niveau d'expression d'ETO2 endogène plus fort que dans les autres progéniteurs (chapitre 3). Ces observations suggèrent qu'ETO2 n'est pas un déterminant des CLPs. Par ailleurs, la surexpression d'ETO2 entraîne un blocage plus tardif des voies lymphocytaires, comme en témoigne l'absence de cellules lymphocytaires matures dans le sang. Je propose que cet effet soit principalement causé par la liaison d'ETO2 sur les gènes-cibles d'E2A et HEB ou par la séquestration de ces facteurs dans les cellules en maturation. Selon notre modèle érythrocytaire, le blocage de la différenciation ne passerait pas par une séquestration des protéines E. La perte de fonction de E2A entraîne une baisse des CLP fonctionnelle et des cellules matures (Borghesi et al., 2005). Je propose que les CLPs ne soient pas affectés par la surexpression d'ETO2 dû à l'absence d'autres facteurs requis pour la répression par ETO2. Par contre, ces facteurs seraient présents dans les cellules plus matures, permettant la répression par ETO2. Je propose donc qu'en fonction du contexte cellulaire, ETO2 lie les protéines E fixées sur la chromatine, les convertissant en répresseurs transcriptionnels.

#### **4.2.2.4 Notch1 et Wnt**

Notch est un récepteur membranaire, dont les ligands sont aussi des protéines membranaires : Jagged-1, Jagged-2 et delta. Suite à la liaison de son ligand, la partie intracellulaire de Notch est clivée par protéolyse, puis transloquée au noyau où Notch peut agir à titre de facteur de transcription. Le ligand Jagged-1 est fortement exprimé dans les ostéoblastes, tandis que Notch est exprimé dans les cellules souches (Calvi et al., 2003). Le rôle de Notch au sein du système hématopoïétique se situerait donc principalement au niveau de la niche hématopoïétique. La surexpression d'ETO2 dans les cellules de la moelle osseuse ressemble étrangement à la surexpression du récepteur Notch1, à la différence que l'expansion opérée par Notch1 soit de moins grande envergure (Stier et al., 2002). Tout comme ETO2, Notch1 bloque la différenciation et provoque l'apparition de HPP (voir chapitre 3), sans modifier la prolifération des cellules souches. D'ailleurs, au niveau des cellules érythrocytaires, l'activation constitutive de Notch entraîne le blocage de

la différenciation érythrocytaire et suggère qu'ETO2 et Notch soient impliqués dans la même voie (Lam et al., 2000). Tel qu'exposé précédemment, le blocage de la différenciation par Notch corrèle avec une diminution de HSP73, un partenaire identifié par le TAPTAG (annexe I). Il est possible qu'ETO2 active la voie Notch qui à son tour inhibe HSP73, affectant directement le complexe SCL et, ainsi, la différenciation érythrocytaire.

Des recherches chez la drosophile ont permis de démontrer que l'expression de ETO amplifie les signaux Notch (Wildonger and Mann, 2005). De plus, des analyses d'expression globale indiquent que la fusion AML1-ETO stimule l'expression de Notch1, ainsi que celle de Wnt (Alcalay et al., 2003), une autre voie de signalisation impliquée dans l'auto-renouvellement des cellules souches. La voie Wnt promeut la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (Reya et al., 2003; Willert et al., 2003), tandis que la signalisation par Notch réprime les programmes de différenciation (Duncan et al., 2005).

Je propose donc qu'ETO2 favorise l'expansion des cellules souches en activant indirectement l'expression des composants des voies de signalisation Wnt et Notch. Par exemple, si ETO2 réprime la transcription de régulateurs négatifs des voies Notch ou Wnt, cela pourrait favoriser ces voies de signalisation et, ainsi, contribuer à l'auto-renouvellement des cellules-souches. Afin de vérifier cette hypothèse, des analyses de *ChIP on ChIP* avec ETO2 permettraient un survol global des gènes-cibles d'ETO2 et l'identification de régulateurs des voies Notch ou Wnt. Afin de mieux comprendre les effets d'ETO2 sur l'auto-renouvellement, il est essentiel de définir quelles sont les voies de signalisation impliquées.

#### **4.2.2.5 p21**

La majorité des cellules souches de la moelle osseuse réside dans un état de quiescence (Fleming et al., 1993; Gothot et al., 1997; Leemhuis et al., 1996; Randall and Weissman, 1997). Le groupe de Scadden a clairement démontré le rôle de p21 dans les CSH en tant que gardien de la quiescence cellulaire (Cheng et al., 2000). En absence de *p21* et sous conditions homéostatiques, la prolifération des CSH est augmentée spécifiquement

dans cette population. Toutefois, suite à des injures myélotoxiques ou des transplantations secondaires, les souris  $p21^{-/-}$  meurent plus facilement, dû à une déplétion des cellules hématopoïétiques. Ces analyses suggèrent que p21 restreint l'entrée des cellules quiescentes dans le cycle cellulaire, les protégeant ainsi d'une déplétion prématurée. Ainsi, chez l'humain, il a été démontré que des cellules primitives ( $CD36^{+}CD38^{-}$ ) déficientes pour p21 subissent une expansion *in vitro* et *in vivo*, contrairement aux cellules contrôles qui déclinent (Stier et al., 2003). Ces évidences chez la souris et l'humain supportent un rôle pour p21 dans la régulation de la quiescence.

Dans le chapitre 2 (Goardon et al., 2006), je démontre qu'ETO2 inactive le gène  $p21$  dans les progéniteurs érythrocytaires. De plus, l'expansion des cellules souches que j'observe (chapitre 3) ressemble à l'effet de la perte de p21 sur les cellules souches en conditions homéostatiques, suggérant que p21 et ETO2 agiraient dans la même voie. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai mesuré si l'expansion des cellules souches par ETO2 était affectée en absence de p21. Si l'inactivation de p21 est un événement important pour promouvoir l'expansion, je ne devrais donc pas constater de différences entre les cellules surexprimant ETO2 et les cellules contrôles  $p21^{-/-}$ . Je présente en annexe III que l'expansion *in vitro* des KSL par ETO2 est amoindrie dans les cellules  $p21^{-/-}$  bien que supérieure au contrôle. Je propose donc qu'ETO2 inactive le gène p21, mais que d'autres cibles non identifiées soient aussi importantes afin de reproduire l'expansion d'ETO2. Cette relation ETO2/p21 suggère que l'auto-renouvellement causé par ETO2 implique un blocage de la quiescence, soit en forçant les cellules quiescentes à entrer dans le cycle cellulaire, soit en prévenant les cellules actives à entrer en quiescence. Selon le modèle de stabilité clonale, la population de cellules souches contribuant aux cellules matures est très dynamique. Une fois activés, des clones stables peuvent s'expandre, puis retourner dans un état de quiescence (McKenzie et al., 2006). En régulant négativement l'expression de  $p21$ , tel que montré dans les cellules érythrocytaires (chapitre 2), ETO2 devient ainsi un régulateur indirect de la quiescence.

#### 4.2.2.6 GFI-1 et GFI-1b

ETO2 interagit directement avec les protéines à doigt de zinc GFI-1 et GFI-1b, associées à la répression transcriptionnelle (McGhee et al., 2003; Schuh et al., 2005). Les protéines GFI reconnaissent la même séquence d'ADN et leur patron d'expression mutuellement exclusif suggère que leur fonction au sein du système hématopoïétique est complémentaire. Alors que GFI-1b est exprimé dans la lignée méga-érythrocytaire, GFI-1 est exprimée dans les neutrophiles, les cellules pré-B et pré-T (Karsunky et al., 2002; Hock et al., 2003; Saleque et al., 2002). Contrairement à leur patron exclusif dans les différentes lignées du système hématopoïétiques, toutes deux sont exprimées dans les cellules souches hématopoïétiques (Phillips et al., 2000; Osawa et al., 2002; Hock et al., 2004; Zeng et al., 2004). Toutefois, les pertes de fonction de GFI-1 et GFI-1b démontrent que seul GFI-1 y jouerait un rôle crucial (Hock and Orkin, 2006). En arrêtant la prolifération des cellules souches, GFI-1 permet aux cellules de rester en état de quiescence et ainsi de préserver le pool de cellules souches pour une plus longue période (Hock et al., 2004; Zeng et al., 2004). Ce faisant, GFI-1 favorise ainsi leur auto-renouvellement, par opposition à leur différenciation et extinction. Les défauts des cellules souches *GFI-1<sup>-/-</sup>* ne sont d'ailleurs observables qu'en transplantation sérielle où l'auto-renouvellement des cellules est fortement mis à l'épreuve. Ce phénotype d'épuisement des cellules souches ressemble énormément à celui causé par la perte de p21 (Cheng et al., 2000). Le messager de p21 est diminué dans les cellules *GFI-1<sup>-/-</sup>* (Hock et al., 2004) qui sont principalement retrouvées dans la phase G0 du cycle cellulaire (Zeng et al., 2004), tel qu'observé pour les cellules p21. GFI-1 et p21 font possiblement partie de la même voie.

Quant à GFI-1b, il est essentiel pour le développement des lignées érythro-mégakaryocytaires (Saleque et al., 2002). En réprimant l'expression de *Gfi-1b* dans les progéniteurs érythrocytaires, ETO2 permet l'expansion de ces cellules au détriment de leur différenciation [chapitre 2 : (Goardon et al., 2006)]. En plus de ce contrôle transcriptionnel, ETO2 interagit directement avec GFI-1b dans les précurseurs érythrocytaires (Schuh et al., 2005), suggérant que les complexes SCL/ETO2/GFI-1b répriment les gènes de



différenciation. L'interaction de GFI-1b et ETO2 pourraient renforcer mutuellement leur pouvoir de répression transcriptionnelle des gènes cibles de SCL. Donc, ETO2 affecte la fonction GFI-1b sur les plans transcriptionnels et protéiques.

Comme les protéines GFI-1 sont des répresseurs, leur interaction avec le co-répresseur ETO2 suggère le renforcement des fonctions répressives de GFI-1b dans la lignée érythrocytaire. Par contre, au niveau des cellules souches, puisque la surexpression d'ETO2 et la perte de fonction de GFI-1 favorisent toutes deux l'auto-renouvellement, ETO2 pourrait par exemple séquestrer GFI-1 en l'empêchant d'aller sur ses gènes-cibles.

#### **4.2.2.7 Une attaque sur tous les fronts**

Mes recherches dans les cellules érythrocytaires et les cellules souches révèlent qu'ETO2 affecte à la fois la différenciation et l'auto-renouvellement. J'ai démontré par quels mécanismes ETO2 bloquait l'activité du complexe SCL et la différenciation érythrocytaire. Dans les cellules souches, je propose plusieurs mécanismes qui visent à la fois le contrôle de gènes associés à l'auto-renouvellement (p21, Gfi-1, Wnt et Notch) et de voies associées à la différenciation (SCL, GATA-1, C/EBP- $\alpha$ ). La Figure 4-3 présente un modèle global d'action d'ETO2 au sein du système hématopoïétique.

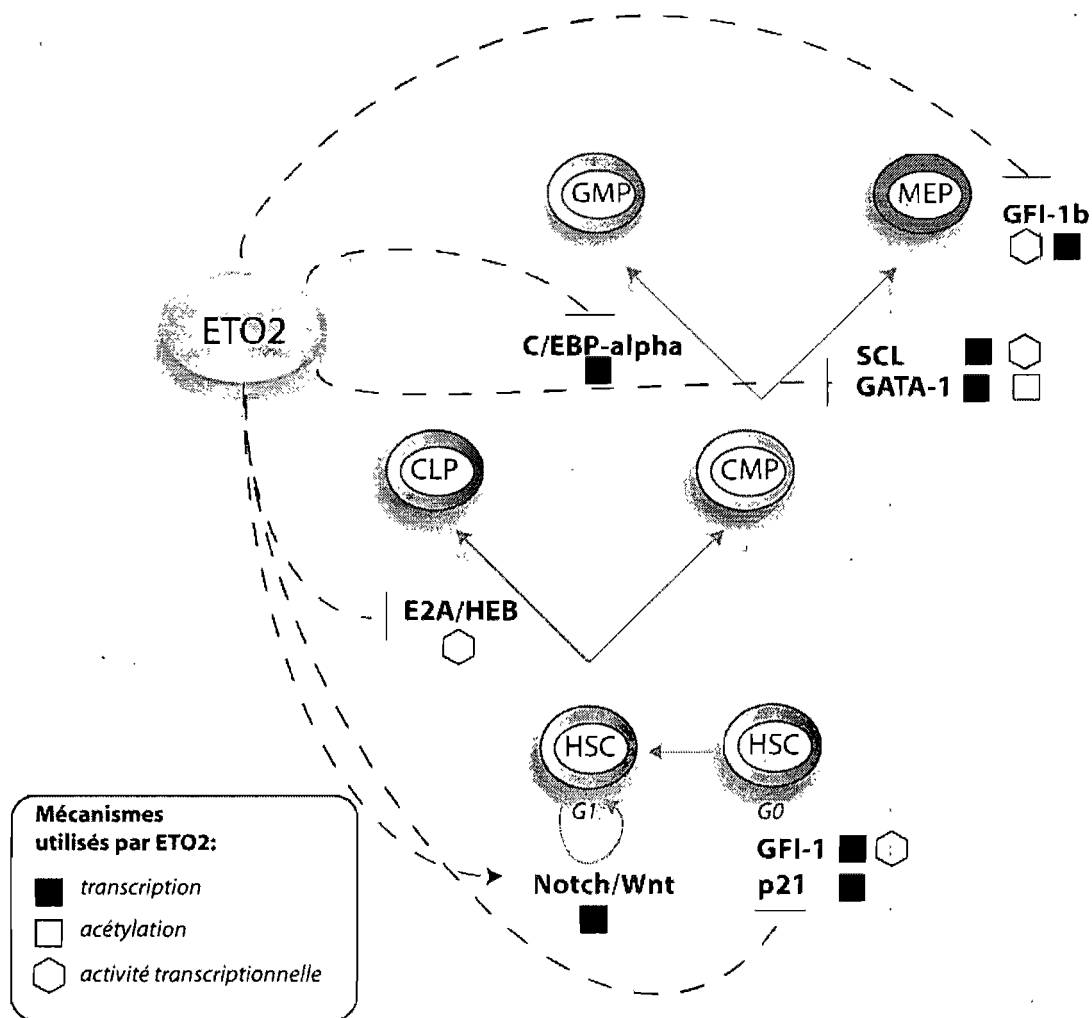


Figure 4-3. ETO2 bloque la différenciation et stimule l'auto-renouvellement.

En se liant aux facteurs de transcription dirigeant la différenciation ou en réprimant leur transcription, ETO2 bloque toutes les voies de différenciation possibles des cellules souches hématopoïétiques. Simultanément, ETO2 active les voies de Notch et Wnt associées à l'auto-renouvellement, tandis qu'il réprime la transcription de Gfi-1 et p21, deux gardiens de la quiescence.

## Conclusion

Cette étude avait pour objectif la révélation de nouveaux mécanismes de régulation transcriptionnelle. L'utilisation du complexe SCL comme point de départ m'a permis d'identifier ETO2, un nouveau joueur à large spectre affectant, tout comme SCL, le développement des érythrocytes et des cellules souches. L'identification d'ETO2 apporte plusieurs éléments-clés à notre compréhension globale de la régulation transcriptionnelle hématopoïétique et à notre vision de thème récurrent en biologie développementale : la transition cellulaire prolifération/différenciation et l'auto-renouvellement des cellules souches. À ce jour, peu de régulateurs aussi versatiles ont été identifiés.

Avec ses nombreux domaines d'interaction, ETO2 crée un pont entre les facteurs de transcription et les modificateurs de la chromatine, permettant une régulation précise et spécifique de la transcription. J'ai mis en lumière un nouveau mécanisme de régulation transcriptionnelle qui ne reposait pas uniquement sur l'échange de co-facteurs, mais sur les ratios activateurs/co-répresseurs liés aux séquences régulatrices. La stœchiométrie d'ETO2 au sein des complexes SCL et, possiblement, au sein d'autres complexes détermine l'activation ou la répression des programmes génétiques cellulaires. ETO2 arrive ainsi à orchestrer la différenciation, la prolifération et l'auto-renouvellement. Il s'agit en fait d'un des premiers gènes identifiés gouvernant la transition prolifération/différenciation des cellules érythrocytaire et l'auto-renouvellement des cellules souches. La diversité cellulaire requiert sans nul doute une régulation fine de la transcription et ETO2 fait partie des régulateurs-clés de la transcription hématopoïétique.

### 4.3 Références

- Ahn, M.Y., Huang, G., Bae, S.C., Wee, H.J., Kim, W.Y., and Ito, Y. (1998). Negative regulation of granulocytic differentiation in the myeloid precursor cell line 32Dcl3 by ear-2, a mammalian homolog of *Drosophila* seven-up, and a chimeric leukemogenic gene, AML1/ETO. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 1812-1817.
- Alcalay, M., Meani, N., Gelmetti, V., Fantozzi, A., Fagioli, M., Orleth, A., Riganelli, D., Sebastiani, C., Cappelli, E., Casciari, C., Sciarpi, M.T., Mariano, A.R., Minardi, S.P., Luzzi, L., Muller, H., Di Fiore, P.P., Frosina, G., and Pelicci, P.G. (2003). Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J. Clin. Invest* 112, 1751-1761.
- Bonnet, D. and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730-737.
- Borghesi, L., Aites, J., Nelson, S., Lefterov, P., James, P., and Gerstein, R. (2005). E47 is required for V(D)J recombinase activity in common lymphoid progenitors. *J. Exp. Med.* 202, 1669-1677.
- Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y., and Ogryzko, V. (1998). Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* 396, 594-598.
- Burel, S.A., Harakawa, N., Zhou, L., Pabst, T., Tenen, D.G., and Zhang, D.E. (2001). Dichotomy of AML1-ETO functions: growth arrest versus block of differentiation. *Mol. Cell Biol.* 21, 5577-5590.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., Milner, L.A., Kronenberg, H.M., and Scadden, D.T. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846.
- Chen, L., Segal, D., Hukriede, N.A., Podtelejnikov, A.V., Bayarsaihan, D., Kennison, J.A., Ogryzko, V.V., Dawid, I.B., and Westphal, H. (2002). Ssdp proteins interact with the LIM-domain-binding protein Ldb1 to regulate development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 14320-14325.
- Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M., and Scadden, D.T. (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 287, 1804-1808.
- Choi, Y., Elagib, K.E., Delehanty, L.L., and Goldfarb, A.N. (2006). Erythroid inhibition by the leukemic fusion AML1-ETO is associated with impaired acetylation of the major erythroid transcription factor GATA-1. *Cancer Res.* 66, 2990-2996.

- de Guzman,C.G., Warren,A.J., Zhang,Z., Gartland,L., Erickson,P., Drabkin,H., Hiebert,S.W., and Klug,C.A. (2002). Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. *Mol. Cell Biol.* 22, 5506-5517.
- Desrosiers,M., Lecuyer,E., Herblot,S., Tremblay,M., Lambert,J.A., Thibault,P., and Hoang,T. (2008). Deciphering a novel role of E2A and HEB on the hematopoietic transcription factor SCL. in preparation.
- Duncan,A.W., Rattis,F.M., DiMascio,L.N., Congdon,K.L., Pazianos,G., Zhao,C., Yoon,K., Cook,J.M., Willert,K., Gaiano,N., and Reya,T. (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Immunol.* 6, 314-322.
- Dunne,J., Cullmann,C., Ritter,M., Soria,N.M., Drescher,B., Debernardi,S., Skoulakis,S., Hartmann,O., Krause,M., Krauter,J., Neubauer,A., Young,B.D., and Heidenreich,O. (2006). siRNA-mediated AML1/MTG8 depletion affects differentiation and proliferation-associated gene expression in t(8;21)-positive cell lines and primary AML blasts. *Oncogene* 25, 6067-6078.
- Ejiri,S. (2002). Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1-21.
- Elagib,K.E. and Goldfarb,A.N. (2007). Oncogenic pathways of AML1-ETO in acute myeloid leukemia: multifaceted manipulation of marrow maturation. *Cancer Lett.* 251, 179-186.
- Fenske,T.S., Pengue,G., Mathews,V., Hanson,P.T., Hamm,S.E., Riaz,N., and Graubert,T.A. (2004). Stem cell expression of the AML1/ETO fusion protein induces a myeloproliferative disorder in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 15184-15189.
- Fleming,W.H., Alpern,E.J., Uchida,N., Ikuta,K., Spangrude,G.J., and Weissman,I.L. (1993). Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *J. Cell Biol.* 122, 897-902.
- Galcheva-Gargova,Z., Konstantinov,K.N., Wu,I.H., Klier,F.G., Barrett,T., and Davis,R.J. (1996). Binding of zinc finger protein ZPR1 to the epidermal growth factor receptor. *Science* 272, 1797-1802.
- Gangwani,L. (2006). Deficiency of the zinc finger protein ZPR1 causes defects in transcription and cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* 281, 40330-40340.
- Gangwani,L., Mikrut,M., Galcheva-Gargova,Z., and Davis,R.J. (1998). Interaction of ZPR1 with translation elongation factor-1alpha in proliferating cells. *J. Cell Biol.* 143, 1471-1484.

- Goardon,N., Lambert,J.A., Rodriguez,P., Nissaire,P., Herblot,S., Thibault,P., Dumenil,D., Strouboulis,J., Romeo,P.H., and Hoang,T. (2006). ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J.* 25, 357-366.
- Goldfarb,A.N., Lewandowska,K., and Shoham,M. (1996). Determinants of helix-loop-helix dimerization affinity. Random mutational analysis of SCL/tal. *J. Biol. Chem.* 271, 2683-2688.
- Gothot,A., Pyatt,R., McMahon,J., Rice,S., and Srour,E.F. (1997). Functional heterogeneity of human CD34(+) cells isolated in subcompartments of the G0 /G1 phase of the cell cycle. *Blood* 90, 4384-4393.
- Hock,H., Hamblen,M.J., Rooke,H.M., Schindler,J.W., Saleque,S., Fujiwara,Y., and Orkin,S.H. (2004). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 431, 1002-1007.
- Hock,H., Hamblen,M.J., Rooke,H.M., Traver,D., Bronson,R.T., Cameron,S., and Orkin,S.H. (2003). Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* 18, 109-120.
- Hock,H. and Orkin,S.H. (2006). Zinc-finger transcription factor Gfi-1: versatile regulator of lymphocytes, neutrophils and hematopoietic stem cells. *Curr. Opin. Hematol.* 13, 1-6.
- Huang,S., Qiu,Y., Shi,Y., Xu,Z., and Brandt,S.J. (2000). P/CAF-mediated acetylation regulates the function of the basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL. *EMBO J.* 19, 6792-6803.
- Huang,S., Qiu,Y., Stein,R.W., and Brandt,S.J. (1999). p300 functions as a transcriptional coactivator for the TAL1/SCL oncoprotein. *Oncogene* 18, 4958-4967.
- Hung,H.L., Lau,J., Kim,A.Y., Weiss,M.J., and Blobel,G.A. (1999). CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. *Mol. Cell Biol.* 19, 3496-3505.
- Karsunky,H., Zeng,H., Schmidt,T., Zevnik,B., Kluge,R., Schmid,K.W., Duhrsen,U., and Moroy,T. (2002). Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat. Genet.* 30, 295-300.
- Kiel,M.J., Yilmaz,O.H., Iwashita,T., Yilmaz,O.H., Terhorst,C., and Morrison,S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109-1121.
- Kohzaki,H., Ito,K., Huang,G., Wee,H.J., Murakami,Y., and Ito,Y. (1999). Block of granulocytic differentiation of 32Dcl3 cells by AML1/ETO(MTG8) but not by highly expressed Bcl-2. *Oncogene* 18, 4055-4062.

- Kojima,K., Omoto,E., Hara,M., Sasaki,K., Katayama,Y., Nawa,Y., Kimura,Y., Azuma,T., Takimoto,H., and Harada,M. (1998). Myelodysplastic syndrome with translocation (8;21): a distinct myelodysplastic syndrome entity or M2-acute myeloid leukemia with extensive myeloid maturation? *Ann. Hematol.* 76, 279-282.
- Lam,L.T., Ronchini,C., Norton,J., Capobianco,A.J., and Bresnick,E.H. (2000). Suppression of erythroid but not megakaryocytic differentiation of human K562 erythroleukemic cells by notch-1. *J. Biol. Chem.* 275, 19676-19684.
- Leemhuis,T., Yoder,M.C., Grigsby,S., Aguero,B., Eder,P., and Srour,E.F. (1996). Isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33342 and Rhodamine 123. *Exp. Hematol.* 24, 1215-1224.
- McGhee,L., Bryan,J., Elliott,L., Grimes,H.L., Kazanjian,A., Davis,J.N., and Meyers,S. (2003). Gfi-1 attaches to the nuclear matrix, associates with ETO (MTG8) and histone deacetylase proteins, and represses transcription using a TSA-sensitive mechanism. *J. Cell Biochem.* 89, 1005-1018.
- McKenzie,J.L., Gan,O.I., Doedens,M., Wang,J.C., and Dick,J.E. (2006). Individual stem cells with highly variable proliferation and self-renewal properties comprise the human hematopoietic stem cell compartment. *Nat. Immunol.* 7, 1225-1233.
- Miyamoto,T., Weissman,I.L., and Akashi,K. (2000). AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 7521-7526.
- Osawa,M., Yamaguchi,T., Nakamura,Y., Kaneko,S., Onodera,M., Sawada,K., Jegalian,A., Wu,H., Nakauchi,H., and Iwama,A. (2002). Erythroid expansion mediated by the Gfi-1B zinc finger protein: role in normal hematopoiesis. *Blood* 100, 2769-2777.
- Perissi,V. and Rosenfeld,M.G. (2005). Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 542-554.
- Phillips,R.L., Ernst,R.E., Brunk,B., Ivanova,N., Mahan,M.A., Deanehan,J.K., Moore,K.A., Overton,G.C., and Lemischka,I.R. (2000). The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science* 288, 1635-1640.
- Pocaly,M., Lagarde,V., Etienne,G., Ribeil,J.A., Claverol,S., Bonneu,M., Moreau-Gaudry,F., Guyonnet-Duperat,V., Hermine,O., Melo,J.V., Dupouy,M., Turcq,B., Mahon,F.X., and Pasquet,J.M. (2007). Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 21, 93-101.
- Radomska,H.S., Huettner,C.S., Zhang,P., Cheng,T., Scadden,D.T., and Tenen,D.G. (1998). CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction

- of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol. Cell Biol.* 18, 4301-4314.
- Randall, T.D. and Weissman, I.L. (1997). Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. *Blood* 89, 3596-3606.
- Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nüsse, R., and Weissman, I.L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-414.
- Rochford, J.J., Semple, R.K., Laudes, M., Boyle, K.B., Christodoulides, C., Mulligan, C., Lelliott, C.J., Schinner, S., Hadaschik, D., Mahadevan, M., Sethi, J.K., Vidal-Puig, A., and O'Rahilly, S. (2004). ETO/MTG8 is an inhibitor of C/EBP $\beta$  activity and a regulator of early adipogenesis. *Mol. Cell Biol.* 24, 9863-9872.
- Saleque, S., Cameron, S., and Orkin, S.H. (2002). The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes Dev.* 16, 301-306.
- Schuh, A.H., Tipping, A.J., Clark, A.J., Hamlett, I., Guyot, B., Iborra, F.J., Rodriguez, P., Strouboulis, J., Enver, T., Vyas, P., and Porcher, C. (2005). ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. *Mol. Cell Biol.* 25, 10235-10250.
- Schwieger, M., Lohler, J., Friel, J., Scheller, M., Horak, I., and Stocking, C. (2002). AML1-ETO inhibits maturation of multiple lymphohematopoietic lineages and induces myeloblast transformation in synergy with ICSBP deficiency. *J. Exp. Med.* 196, 1227-1240.
- Shimada, H., Ichikawa, H., Nakamura, S., Katsu, R., Iwasa, M., Kitabayashi, I., and Ohki, M. (2000). Analysis of genes under the downstream control of the t(8;21) fusion protein AML1-MTG8: overexpression of the TIS11b (ERF-1, cMG1) gene induces myeloid cell proliferation in response to G-CSF. *Blood* 96, 655-663.
- Shimada, H., Ichikawa, H., and Ohki, M. (2002). Potential involvement of the AML1-MTG8 fusion protein in the granulocytic maturation characteristic of the t(8;21) acute myelogenous leukemia revealed by microarray analysis. *Leukemia* 16, 874-885.
- Stier, S., Cheng, T., Dombkowski, D., Carlesso, N., and Scadden, D.T. (2002). Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 99, 2369-2378.

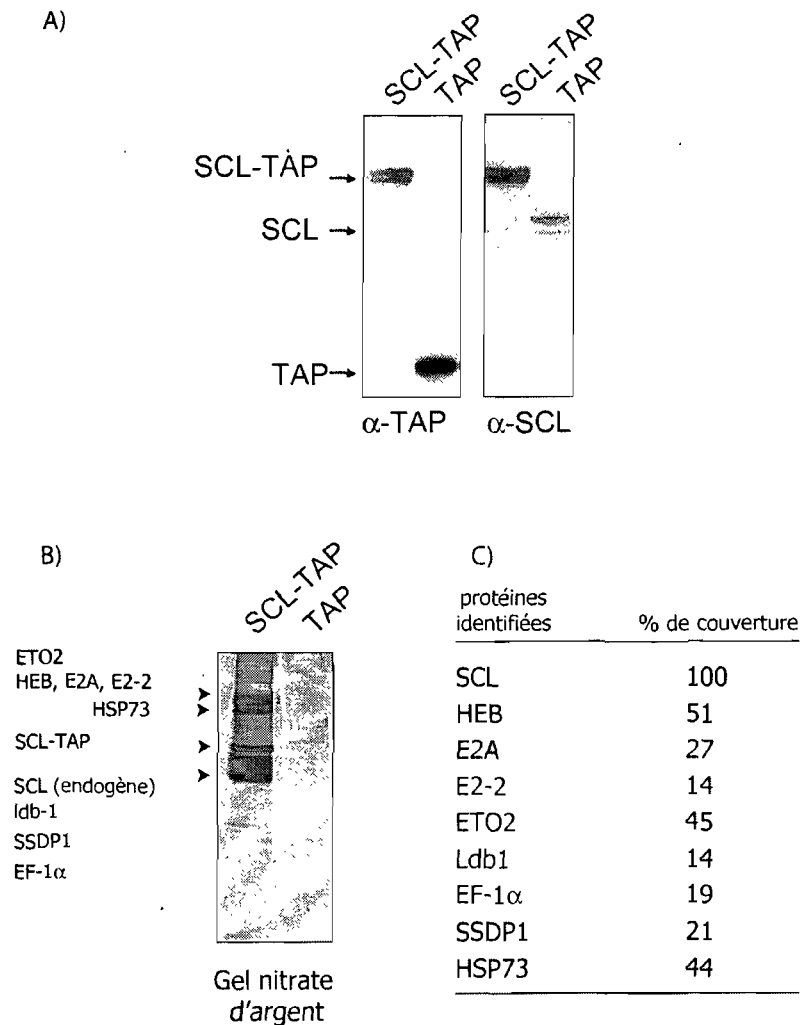


- Stier,S., Cheng,T., Forkert,R., Lutz,C., Dombkowski,D.M., Zhang,J.L., and Scadden,D.T. (2003). Ex vivo targeting of p21Cip1/Waf1 permits relative expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood* 102, 1260-1266.
- Tenen,D.G., Hromas,R., Licht,J.D., and Zhang,D.E. (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90, 489-519.
- Tsukahara,F. and Maru,Y. (2004). Identification of novel nuclear export and nuclear localization-related signals in human heat shock cognate protein 70. *J. Biol. Chem.* 279, 8867-8872.
- van Meyel,D.J., Thomas,J.B., and Agulnick,A.D. (2003). Ssdp proteins bind to LIM-interacting co-factors and regulate the activity of LIM-homeodomain protein complexes in vivo. *Development* 130, 1915-1925.
- Wang,J., Sauntharajah,Y., Redner,R.L., and Liu,J.M. (1999). Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer Res.* 59, 2766-2769.
- Westendorf,J.J., Yamamoto,C.M., Lenny,N., Downing,J.R., Selsted,M.E., and Hiebert,S.W. (1998). The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol. Cell Biol.* 18, 322-333.
- Wildonger,J. and Mann,R.S. (2005). Evidence that nervy, the Drosophila homolog of ETO/MTG8, promotes mechanosensory organ development by enhancing Notch signaling. *Dev. Biol.* 286, 507-520.
- Willert,K., Brown,J.D., Danenberg,E., Duncan,A.W., Weissman,I.L., Reya,T., Yates,J.R., III, and Nusse,R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452.
- Wu,L. (2006). Structure and functional characterization of single-strand DNA binding protein SSDP1: carboxyl-terminal of SSDP1 has transcription activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 977-984.
- Xu,Z., Meng,X., Cai,Y., Liang,H., Nagarajan,L., and Brandt,S.J. (2007). Single-stranded DNA-binding proteins regulate the abundance of LIM domain and LIM domain-binding proteins. *Genes Dev.* 21, 942-955.
- Yamasaki,H., Era,T., Asou,N., Sanada,I., Matutes,E., Yamaguchi,K., and Takatsuki,K. (1995). High degree of myeloid differentiation and granulocytosis is associated with t(8;21) smoldering leukemia. *Leukemia* 9, 1147-1153.

- Zeng,H., Yucel,R., Kosan,C., Klein-Hitpass,L., and Moroy,T. (2004). Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *EMBO J.* 23, 4116-4125.
- Zhang,D.E., Zhang,P., Wang,N.D., Hetherington,C.J., Darlington,G.J., and Tenen,D.G. (1997). Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 569-574.
- Zhang,J., Kalkum,M., Yamamura,S., Chait,B.T., and Roeder,R.G. (2004a). E protein silencing by the leukemogenic AML1-ETO fusion protein. *Science* 305, 1286-1289.
- Zhang,P., Iwasaki-Arai,J., Iwasaki,H., Fenyus,M.L., Dayaram,T., Owens,B.M., Shigematsu,H., Levantini,E., Huettner,C.S., Lekstrom-Himes,J.A., Akashi,K., and Tenen,D.G. (2004b). Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity.* 21, 853-863.

## **ANNEXES**

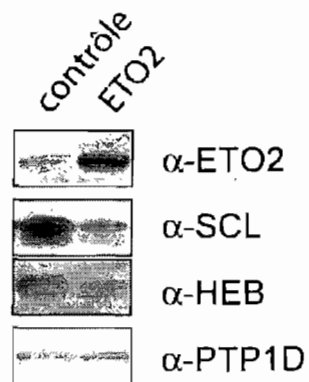
## Annexe I : Purification de complexes SCL par la méthode du TAP-TAG



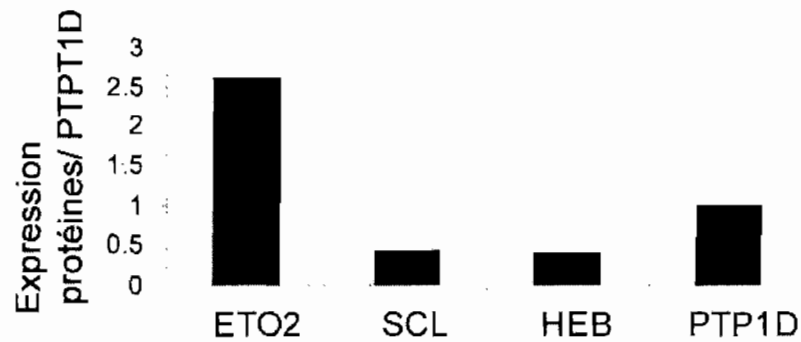
A) Buvarage de Western montrant l'expression de SCL, la protéine de fusion SCL-TAP et du TAP seul dans les cellules TF-1 infectées avec MSCV SCL-TAP ou MSCV TAP. B) Gel de protéine colorée au nitrate d'argent obtenu suite à la purification TAP. C) Résultats de spectrométrie de masse des bandes analysées. Le pourcentage de couverture représente l'abondance des peptides retrouvés pour chaque protéine, normalisé par rapport à l'appât SCL.

## Annexe II : La surexpression d'ETO2 induit une diminution des niveaux protéiques de SCL

A)

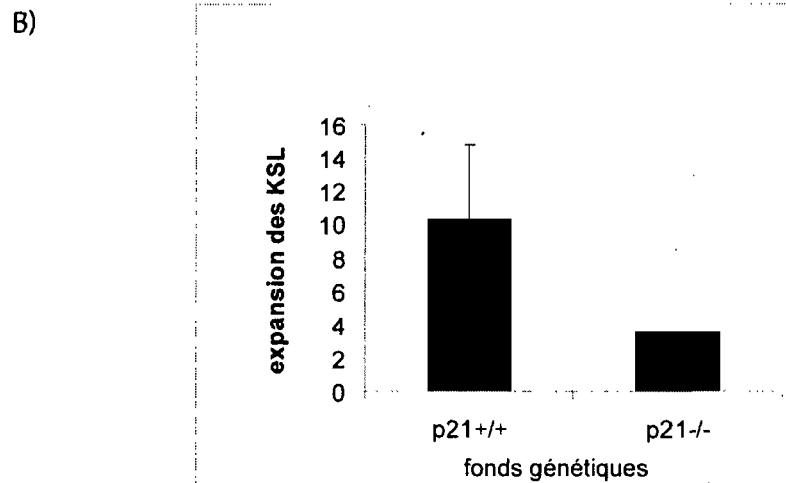
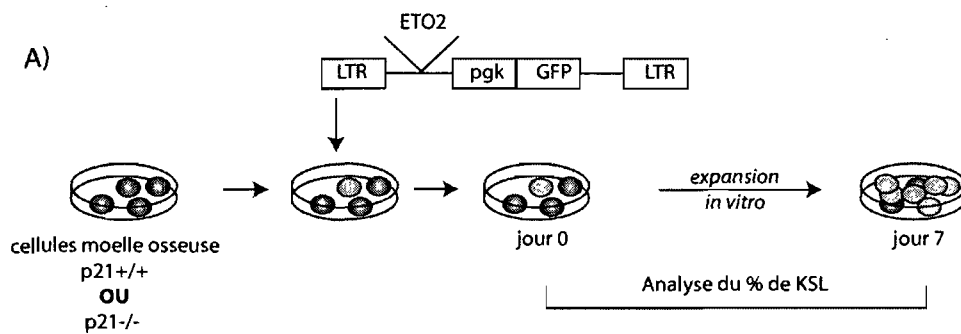


B)



A) Les cellules TF-1 transduites avec le vecteur rétroviral contrôle MSCV ou ETO2 ont été analysées par buvardage de western pour l'expression d'ETO2, SCL, HEB et le contrôle PTP1D. B) Les niveaux protéiques ont été déterminés par densitométrie, puis rapportés sur les niveaux de PTP1D.

### Annexe III : L'expansion des cellules souches provoquée par ETO2 est amoindrie dans un fond génétique nul pour p21



A) Les cellules de la moelle osseuse p21<sup>-/-</sup> ou p21<sup>+/+</sup> ont été transduites avec ETO2-GFP ou GFP seulement, puis gardées 7 jours en culture. Le pourcentage de cellules KSL (c-kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup> et Lin<sup>-</sup>) a ensuite été déterminé par FACS. B) L'expansion des KSL en présence d'ETO2 est moins importante dans les cellules p21<sup>-/-</sup> que dans les cellules contrôles. Le graphique présente l'expansion causée par ETO2 du jour 0 au jour 7, normalisée par rapport à l'expansion du contrôle.